



**Marise Fernandes de
Oliveira**

**Evolução da carga microbiológica de uma refeição
pré-cozinhada – Resultados experimentais e
Microbiologia Preditiva**



**Marise Fernandes de
Oliveira**

**Evolução da carga microbiológica de uma refeição
pré-cozinhada – Resultados experimentais e
Microbiologia Preditiva**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Química dos Alimentos, realizada sob a orientação científica da Doutora Ivonne Delgadillo (professora associada com agregação) e do Doutor Jorge Saraiva (investigador auxiliar) do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, e da Dr^a. Rita Martins e Dr^a. Solange Pereira da empresa Pascoal & Filhos S.A..

o júri

presidente

Professor Doutor Manuel António Coimbra
professor associado com agregação da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Paula Cristina Maia Teixeira
professora auxiliar da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa
(Porto)

Professora Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo (orientadora)
professora associada com agregação da Universidade de Aveiro

Professor Doutor Jorge Alexandre Saraiva (co-orientador)
investigador auxiliar da Universidade de Aveiro

Dr^a Rita Martins
Licenciada em Microbiologia. Empresa Pascoal & Filhos S.A.

agradecimentos

Quero prestar o meu sincero agradecimento a todos aqueles que, de algum modo, contribuíram para a realização deste trabalho, em especial

À Doutora Ivonne Delgadillo, minha orientadora

Ao Doutor Jorge Saraiva, meu co-orientador

À empresa Pascoal & Filhos S.A., pelos meios técnicos, à Dr^a Rita Martins e à Dr^a Solange Pereira

À Inês, à Vera, à Catarina e à Marta

Ao Hélder

À Anabela e ao Sérgio

Aos meus pais

palavras-chave

Método “Cook-chill”, segurança alimentar, carga microbiológica, tempo de vida útil, microbiologia preditiva, critérios microbiológicos.

resumo

O desenvolvimento e acesso à informação levaram a uma sociedade de consumo cada vez mais informada e mais exigente. A procura de alimentos sensorialmente apelativos, fáceis e rápidos de preparar, com índices de segurança elevados e sem recurso a conservantes nem outros aditivos é uma tendência crescente nos hábitos alimentares mundiais. Para responder às necessidades desta nova geração de consumidores, nos últimos 30 anos têm vindo a desenvolver-se e aperfeiçoar-se técnicas, que aumentam a vida útil dos alimentos de forma mais eficaz e de modo a manter ao máximo as suas características naturais. Métodos que combinam um processamento suave com o armazenamento a baixas temperaturas, sem emprego de aditivos e/ou conservantes, têm ganho muito relevo. É exemplo o método “Cook-chill”.

Existem na União Europeia critérios microbiológicos estabelecidos para alimentos específicos, os quais se aplicam ao longo de toda a cadeia alimentar, desde o produtor do alimento, às importações e a todo o comércio alimentar intra-comunitário. Tendo em conta estes critérios, os alimentos não devem conter microrganismos, toxinas e/ou metabolitos em quantidades que representem risco para a saúde humana.

Assim, neste trabalho, foi avaliada a carga microbiológica de uma refeição “Cook-chill” e a sua evolução durante o seu tempo de vida útil, tendo em conta os tempos de espera sofridos pela refeição durante as etapas do seu processamento. Verificou-se, efectivamente, que no método “Cook-chill”, os tempos entre as etapas de produção devem ser controlados rigorosamente, uma vez que influenciam a manutenção dos produtos fora da zona de temperaturas de risco (5 a 63°C), e consequentemente a sua qualidade microbiológica.

keywords

Method "Cook-chill", alimentary security, microbiological criteria, shelf-life, predictive microbiology

abstract

The development and access to information has led to a consumer society increasingly informed and more demanding. The demand for sensory appealing food, easy and quick to prepare, with high levels of security and without the use of preservatives or other additives is a growing trend in the diet world habits. To meet the needs of this new consumers generation, in the last 30 years have been developed and refined techniques that increase the shelf-life of foods more efficiently and keep their natural characteristics. Methods that combine a gentle processing with the storage at low temperatures, without use of additives and/or preservatives, had gained much attention. An example is the "Cook-chill" method.

There are, in the European Union, microbiological criteria established for specific foods, which apply throughout the entire food chain, from production of food, imports and all the intra-Community food trade. Given these criteria, food should not contain micro-organisms, toxins and/or metabolites in quantities that might represent risks to human health.

Therefore, this study evaluated the microbial load of a "Cook-chill" meal and its evolution during the shelf-life of the meal, taking into account the waiting time incurred during the meal stages of processing. It was found, actually, that in the "Cook-chill" method time between the stages of production must be strictly controlled, since influences the maintenance of the products outside the temperature range of risk (5 to 63°C), and consequently its microbiological quality.

ÍNDICE.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJECTIVOS	5
<i>2.1 Enquadramento e Justificação do Estudo</i>	<i>5</i>
<i>2.2 Objectivos do Estudo</i>	<i>8</i>
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
<i>3.1 Conservação de Alimentos</i>	<i>13</i>
<i>3.1.1 Breve nota histórica.....</i>	<i>14</i>
<i>3.2 Tecnologias de Conservação de Alimentos</i>	<i>14</i>
<i>3.2.1 Refrigeração de Alimentos.....</i>	<i>16</i>
<i>3.3 Microrganismos com capacidade de crescimento abaixo de 5°C</i>	<i>18</i>
<i>3.3.1 Listeria monocytogenes</i>	<i>18</i>
<i>3.3.2 Yersinia enterocolitica.....</i>	<i>19</i>
<i>3.3.3 Aeromonas hydrophila.....</i>	<i>19</i>
<i>3.3.4 Bacillus cereus.....</i>	<i>20</i>
<i>3.3.5 Clostridium botulinum</i>	<i>20</i>
<i>3.4. Método “Cook-chill”</i>	<i>21</i>
<i>3.5 Tempo de Vida Útil.....</i>	<i>25</i>
<i>3.6 Microrganismos nos Alimentos.....</i>	<i>29</i>
<i>3.6.1 Crescimento microbiano.....</i>	<i>29</i>
<i>3.6.2 Características dos Alimentos que Condicionam o Crescimento Microbiano</i>	<i>31</i>
<i>3.6.2.1 Factores Intrínsecos.....</i>	<i>31</i>
<i>3.6.2.2 Factores Extrínsecos.....</i>	<i>35</i>

3.7 Microbiologia Preditiva	37
3.7.1 Programa ComBase.....	42
3.7.1.1 Modelo de Baranyi.....	42
3.7.1.2 Modelos tri-linear, bifásico e linear	47
4. PARTE EXPERIMENTAL	52
4.1 Material	54
4.1.1 Reagentes e meios de cultura	54
4.1.2 Amostras: “Chili de carne com Arroz Branco”	55
4.2 Métodos	59
4.2.1 Avaliação das características microbiológicas das amostras	59
4.2.2 Análises microbiológicas	60
4.2.2.1 Preparação das amostras	61
4.2.2.2 Preparação das diluições.....	61
4.2.2.3 Contagem de microrganismos totais mesófilos (30°C)	62
4.2.2.4 Contagem de Enterobactereaceae	62
4.2.2.5 Contagem de Coliformes e Escherichia coli	63
4.2.2.6 Pesquisa de Staphylococcus aureus coagulase positivos.....	63
4.2.2.7 Contagem de bolores e leveduras	64
4.2.3 Análises físico-químicas das amostras	64
4.2.3.1 Determinação do pH.....	65
4.2.3.2 Determinação da actividade da água (a_w).....	65
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
5.1 Matérias-Primas	69
5.2 Efeito do tempo de espera entre a cocção e o doseamento da refeição	72
Primeira Amostragem	72
5.2.1 Variação de temperatura após a cocção da refeição	72
5.2.2 Análises microbiológicas	73
5.2.2.1 Contagem de microrganismos totais a 30°C	74
5.2.2.2 Contagem de Enterobactereaceae, Coliformes, Escherichia coli e Staphylococcus aureus coagulase positivo.....	76
5.3 Efeito do tempo de espera entre a cocção e o doseamento da refeição	76

Segunda Amostragem.....	76
5.3.1 Variação de temperatura após a cocção da refeição	76
5.3.2 Análises microbiológicas.....	77
5.3.2.1 Contagem de microrganismos totais a 30°C.....	77
5.3.2.2 Contagem de Enterobactereaceae, Coliformes, Escherichia coli e Staplylococcus aureus coagulase positivo.....	79
5.4 Efeito do tempo de espera entre a cocção e o doseamento da refeição	80
Terceira Amostragem	80
5.4.1 Variação de temperatura após a cocção da refeição	80
5.4.2 Análises microbiológicas.....	81
5.4.2.1 Contagem de microrganismos totais a 30°C.....	81
5.4.2.2 Contagem de Enterobactereaceae, Coliformes, Escherichia coli e Staplylococcus aureus coagulase positivo.....	83
5.5 Efeito do tempo de espera entre a selagem das cuvetes e o arrefecimento rápido	83
Quarta Amostragem	83
5.5.1 Variação de temperatura após o doseamento e selagem das cuvetes	84
5.5.2 Análises microbiológicas.....	84
5.5.2.1 Contagem de microrganismos totais a 30°C.....	84
5.5.2.2 Contagem de Enterobactereaceae, Coliformes, Escherichia coli e Staplylococcus aureus coagulase positivo.....	86
5.6 Diminuição de Temperatura da Refeição ao Longo do Tempo de Espera	87
5.7 Contribuição Relativa das Matérias-Primas para o Produto Final em Termos de Contaminação	88
5.8 Análises físico-químicas	90
5.8.1 Determinação da a_w	90
5.8.2 Determinação do pH.....	90
5.9 Microbiologia Preditiva – ComBase	91
6. CONCLUSÃO.....	101
7. BIBLIOGRAFIA	105

8. ANEXOS

Anexo I - Lista de Definições Relevantes ao Trabalho

Anexo II - Especificações técnicas do filme usado na selagem das amostras

Anexo III - Composição, características e preparação dos meios de cultura usados no trabalho

Anexo IV - Procedimentos experimentais seguidos para as análises microbiológicas

Anexo V - Respostas obtidas pelo programa DMFit – ComBase, relativas à aplicação dos resultados experimentais

Anexo VI - Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração

Anexo VII - Instruções de Trabalho para a Empresa Pascoal & Filhos S.A.

IT₁ - AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TEMPO DE ESPERA, ENTRE A COCÇÃO E A SELAGEM DAS CUVETES, NA CARGA MICROBIOLÓGICA DE REFEIÇÕES “COOK-CHILL”.

IT₂ - AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TEMPO DE ESPERA, ENTRE A SELAGEM DAS CUVETES E A REDUÇÃO RÁPIDA DE TEMPERATURA ATÉ 3°C, NA CARGA MICROBIOLÓGICA DE REFEIÇÕES “COOK-CHILL”.

IT₃ - MICROBIOLOGIA PREDITIVA

APLICAÇÃO DE DADOS EXPERIMENTAIS DE CARGA MICROBIOLÓGICA – COMBASE.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios microbiológicos estabelecidos para pratos cozinhados.	6
Tabela 2. Critérios microbiológicos estabelecidos para alguns alimentos relevantes a este estudo...	7
Tabela 3. Exemplos de técnicas anti-microbianas empregues na preservação de alimentos.	15
Tabela 4. Condições óptimas de armazenamento refrigerado para alimentos distintos.	18
Tabela 5. Comparação dos tipos proteolítico e não proteolítico de <i>Clostridium botulinum</i>	21
Tabela 6. Exemplos de temperaturas de refrigeração estipuladas pela legislação de alguns países da União Europeia.	23
Tabela 7. Valores de alguns dos parâmetros relacionados com o crescimento da <i>Listeria monocytogenes</i> , que explicam parte da sua resistência.	27
Tabela 8. Condições de temperatura, pH, a_w necessárias ao crescimento de alguns microrganismos.	33
Tabela 9. Classificação dos microrganismos de acordo com os seus requisitos de temperatura.	35
Tabela 10. Valores mínimos de a_w , necessários para o desenvolvimento de microrganismos.	36
Tabela 11. Valores de a_w , de alguns alimentos.	36
Tabela 12. Factores intrínsecos e extrínsecos que afectam o crescimento microbiano.	37
Tabela 13. Pontos-chave do sistema de HACCP e da microbiologia preditiva. ³⁸	40
Tabela 14. Informação nutricional da refeição “Chili de Carne com Arroz Branco”.	56
Tabela 15. Delineamento das análises realizadas na 1ª, 2ª e 3ª amostragens.	59
Tabela 16. Delineamento das análises realizadas na 4ª amostragem.	60
Tabela 17. Teor de fungos das matérias-primas usadas na confecção da refeição em estudo na 3ª amostragem.	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aumento da duração da fase lag com a diminuição da temperatura.....	17
Figura 2. Efeito da temperatura no crescimento microbiano.	22
Figura 3. Fluxograma representativo do método “Cook-Chill” (Adaptado de Food Safety Authority of Ireland, 2006).	24
Figura 4. Esquema representativo da tecnologia de barreiras.	28
Figura 5. Curva de crescimento microbiano.	30
Figura 6. Representação esquemática da viabilidade do crescimento dos microrganismos consoante o valor do pH da matriz em que estes se encontram.....	32
Figura 7. Exemplo de uma curva de crescimento microbiano gerada pelo modelo de Gompertz. .	43
Figura 8. Exemplo de uma curva de crescimento microbiano gerada pelo modelo de Baranyi e Roberts- no lag.	43
Figura 9. Exemplo de uma curva de crescimento microbiano gerada pelo modelo de Baranyi e Roberts- no asymptot.....	44
Figura 10. Exemplo de uma curva de crescimento microbiano gerada pelo modelo de Baranyi e Roberts - complete model.....	45
Figura 11. Exemplo de uma curva de crescimento microbiano gerada pelo modelo de Baranyi e Roberts.....	46
Figura 12. Exemplo de uma curva de crescimento microbiano gerada pelo modelo tri-linear.....	47
Figura 13. Exemplos de curvas de crescimento microbiano geradas pelo modelo bifásico (a) sem fase lag e (b) sem fase estacionária.	48
Figura 14. Exemplo de uma curva de crescimento microbiano gerada pelo modelo linear.....	48
Figura 15. Esquema ilustrativo das etapas de produção estudadas (a), esquemas do planeamento do experimental a seguir para estudo dos tempos de espera a que as refeições foram submetidas, tempo de espera entre o fim da cocção e o doseamento (b) e entre a selagem das cuvetes e a redução rápida de temperatura (c).	54
Figura 16. “Chili de carne com Arroz Branco”.....	55
Figura 17. Fluxograma de produção da refeição Chili de Carne com Arroz Branco, pelo método Cook-chill.....	57
Figura 18. Amostras da refeição “Chili de Carne com Arroz Branco”.	58
Figura 19. Média da carga microbiológica total mesófila das matérias-primas analisadas na 1ª, 2ª 3ª amostragens.	70

Figura 20. Contagens de coliformes totais nas matérias-primas analisadas.....	70
Figura 21. Contagens de Enterobactérias nas matérias-primas analisadas.....	71
Figura 22. Variação de temperatura durante a espera das partes integrantes da refeição, antes de se efectuar o doseamento para as cuvetes. Temperatura medida dentro do tabuleiro.....	72
Figura 23. Variação de temperatura das partes integrantes da refeição, antes de se efectuar a redução rápida de temperatura. Temperatura medida dentro da cuvette em amostras com tempos de espera antes do doseamento diferentes.....	73
Figura 24. Variação carga microbiológica da refeição completa (chili de carne com arroz) ao longo do armazenamento, considerando amostras com tempos de espera diferentes entre a cocção e o doseamento na 1ª amostragem.....	74
Figura 25. Variação carga microbiológica do chili de carne ao longo do armazenamento, considerando amostras com tempos de espera diferentes antes do doseamento, na 1ª amostragem.....	74
Figura 26. Variação carga microbiológica da refeição completa (chili de carne com arroz) tendo em conta os tempos de espera sofridos, na 1ª amostragem.	75
Figura 27. Variação carga microbiológica do chili de carne, tendo em conta os tempos de espera sofridos, na 1ª amostragem.....	75
Figura 28. Variação de temperatura durante a espera, das partes integrantes da refeição, entre o término da cocção e o doseamento das cuvetes, na 2ª amostragem. Temperatura medida dentro do tabuleiro.....	77
Figura 29. Variação carga microbiológica do chili de carne ao longo do armazenamento, considerando amostras com tempos de espera diferentes entre o fim da cocção e o doseamento das cuvetes, na 2ª amostragem.	78
Figura 30. Variação carga microbiológica do arroz ao longo do armazenamento, considerando amostras com tempos de espera diferentes entre o fim da cocção e o doseamento das cuvetes, na 2ª amostragem.....	78
Figura 31. Variação carga microbiológica do chili de carne, tendo em conta os tempos de espera sofridos, na 2ª amostragem.	79
Figura 32. Variação carga microbiológica do arroz, tendo em conta os tempos de espera sofridos, na 2ª amostragem.....	79
Figura 33. Variação de temperatura durante a espera, das partes integrantes da refeição, entre o término da cocção e o doseamento das cuvetes, na 3ª amostragem. Temperatura medida dentro do tabuleiro.....	81
Figura 34. Variação carga microbiológica do chili de carne ao longo do armazenamento, considerando amostras com tempos de espera diferentes entre o fim da cocção e o doseamento das cuvetes, na 3ª amostragem.	81

Figura 35. Variação carga microbiológica do arroz ao longo do armazenamento, considerando amostras com tempos de espera diferentes entre o fim da cocção e o doseamento das cuvets, na 3ª amostragem.....	82
Figura 36. Variação carga microbiológica do chili de carne, tendo em conta os tempos de espera sofridos, na 3ª amostragem.....	82
Figura 37. Variação carga microbiológica do arroz, tendo em conta os tempos de espera sofridos, na 3ª amostragem.....	83
Figura 38. Variação de temperatura durante a espera, das partes integrantes da refeição, entre a selagem das cuvets e a redução rápida de temperatura.....	84
Figura 39. Variação carga microbiológica do arroz ao longo do armazenamento, considerando amostras com tempos de espera diferentes entre o a selagem e a redução rápida de temperatura até 3°C.	85
Figura 40. Variação carga microbiológica do chili de carne ao longo do armazenamento, considerando amostras com tempos de espera diferentes entre o a selagem e a redução rápida de temperatura até 3°C.....	85
Figura 41. Variação carga microbiológica do arroz com o tempo de espera (entre a selagem e o abatimento de temperatura) a que este é sujeito.	86
Figura 42. Variação carga microbiológica do chili com o tempo de espera (entre a selagem e o abatimento de temperatura) a que este é sujeito.	86
Figura 43. Diminuição de temperatura do chili e do arroz, ao longo do tempo de espera entre o fim da cocção e a o doseamento das cuvets, nas amostragens 1, 2 e 3.	87
Figura 44. Contribuição relativa (%), em termos de contaminação total, por grama de refeição completa (a) 1ª amostragem, (b) 2ª amostragem e (c) 3ª amostragem.	89
Figura 45. Actividade de água (a_w), medida em cada uma das amostragens representadas.....	90
Figura 46. Valores de pH, medidos em cada uma das amostragens representadas.....	91
Figura 47. Resposta da aplicação do DMFit aos resultados experimentais do arroz com 65 minutos de espera entre o fim da cocção e o doseamento das cuvets, da 2ª amostragem, aplicando o modelo Linear.....	92
Figura 48. Resposta da aplicação do DMFit aos resultados experimentais do arroz com 65 minutos de espera entre o fim da cocção e o doseamento das cuvets, da 2ª amostragem, aplicando o modelo Bifásico sem considerar a fase estacionária.....	93
Figura 49. Resposta da aplicação do DMFit aos resultados experimentais do arroz com 65 minutos de espera entre o fim da cocção e o doseamento das cuvets, da 2ª amostragem, aplicando o modelo Bifásico sem considerar a fase lag.....	93
Figura 50. Resposta da aplicação do DMFit aos resultados experimentais do arroz com 65 minutos de espera entre o fim da cocção e o doseamento das cuvets, da 2ª amostragem, aplicando o modelo Tri-linear.....	94

Figura 51. Resposta da aplicação do DMFit aos resultados experimentais do arroz com 65 minutos de espera entre o fim da cocção e o doseamento das cuvets, da 2ª amostragem, aplicando o modelo completo de Baranyi e Roberts.....	94
Figura 52. Resposta da aplicação do DMFit aos resultados experimentais do arroz com 65 minutos de espera entre o fim da cocção e o doseamento das cuvets, da 2ª amostragem, aplicando o modelo de Baranyi e Roberts sem considerar a fase estacionária.	95
Figura 53. Resposta da aplicação do DMFit aos resultados experimentais do arroz com 80 minutos de espera entre o fim da cocção e o doseamento das cuvets, da 2ª amostragem, aplicando o modelo Linear.....	96
Figura 54. Resposta da aplicação do DMFit aos resultados experimentais do arroz com 80 minutos de espera entre o fim da cocção e o doseamento das cuvets, da 2ª amostragem, aplicando o modelo de Baranyi e Roberts sem considerar a fase estacionária.	96
Figura 55. Resposta da aplicação do DMFit aos resultados experimentais do arroz com 80 minutos de espera entre o fim da cocção e o doseamento das cuvets, da 2ª amostragem, aplicando o modelo completo de Baranyi e Roberts.....	97
Figura 56. Resposta da aplicação do DMFit aos resultados experimentais do chili com 30 minutos de espera entre o fim da cocção e o doseamento das cuvets, da 2ª amostragem, aplicando o modelo Linear.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS

AFDOS	Association of Food & Drug Officials
a_w	Actividade da água
°C	Graus Celcius
CCA	Coliform Chromocoult Agar
D	Tempo de redução decimal (minutos)
E^0	Potencial de oxidação-redução
F	Graus Fahrenheit
HACCP	Hazard Analysis Critical Control Points
HTST	High Temperature Short Time
IT	Instrução de Trabalho
K	Graus Kelvin
MAP	Modified Atmosphere Packaging
mm	Milímetros
mV	miliVolts
NFPA	National Food Processor's Association
NP	Norma Portuguesa
PCA	Plate Count Agar
PCC	Ponto Crítico de Controlo
PMP	Pathogen Modelling Program
RBCA	Rose-Bengal Chloramphenicol Agar
UFC	Unidade Formadora de Colónia
VRBDA	Violet Red Bile Dextrose Agar

1

Introdução

1. Introdução

Existe extrema dificuldade em precisar o início da preocupação das pessoas com a presença e papel dos microrganismos nos alimentos. Evidências mostram que esta preocupação precede o estabelecimento da Bacteriologia e da Microbiologia como ciências.^{1,2}

As doenças de origem alimentar de natureza microbiana são causadas por bactérias, metabolitos destas, vírus ou toxinas. Este tipo de doenças constitui um problema de saúde pública a nível mundial, de modo que a sua prevenção constitui um objectivo de todas as sociedades. A gravidade e incidência das diferentes doenças de origem alimentar varia de país para país, uma vez que, depende do tipo de alimentos consumidos, dos procedimentos de processamento e preparação dos mesmos e da sensibilidade da população.

De uma forma geral, os países têm vindo a melhorar a segurança alimentar através do estabelecimento de critérios microbiológicos para as matérias-primas e para os produtos processados acabados.³ Define-se critério microbiológico como sendo um parâmetro

definido de aceitabilidade de um produto, lote, tipo de alimento ou processo, baseado na ausência, presença ou número de microrganismos, e/ou na quantidade das suas toxinas/metabolitos, por unidade de massa, volume, área ou lote.⁴

Actualmente, o desenvolvimento e acesso à informação levaram a uma sociedade de consumo cada vez mais informada e mais exigente. Daqui resulta uma procura de alimentos sensorialmente apelativos, fáceis de preparar, mas também com índices de segurança elevados.⁵ A exigência de que certos alimentos estejam disponíveis durante todo o ano também se tornou cada vez mais evidente, com o aumento da população urbanizada e substancialmente mais informada. Logo, a necessidade de conservar alimentos por períodos de tempo alargados, é cada vez mais uma preocupação e força motriz de desenvolvimentos tecnológicos. Assim, o desenvolvimento e/ou aperfeiçoamento de técnicas de conservação que permitam a satisfação destas exigências assume extrema importância na indústria alimentar. Implícito no aperfeiçoar das técnicas está, como é evidente, o controlo dos índices de microrganismos patogénicos e/ou deteriorativos.

As mudanças drásticas que o estilo de vida da população mundial, e especificamente que a população portuguesa sofreram nas últimas décadas, conduziram a comportamentos bastante diferentes no que respeita a hábitos alimentares. Factores como a entrada da mulher no mercado de trabalho, diminuição dos agregados familiares, migração populacional para os grandes centros urbanos, o aumento do número de indivíduos a viverem sozinhos e o aumento da distância trabalho-casa, apresentam-se como as principais condicionantes nas mudanças dos hábitos alimentares.

Para responder às necessidades desta nova geração de consumidores, nos últimos 30 anos têm vindo a desenvolver e aperfeiçoar-se técnicas, que aumentam a vida útil dos alimentos de forma mais eficaz e de modo a manter ao máximo as suas características naturais. Métodos que combinam um processamento suave com o armazenamento a baixas temperaturas, sem emprego de aditivos ou conservantes, tem ganho muito relevo. É exemplo o método “Cook-chill” que consiste no confeccionar dos alimentos, proceder ao seu arrefecimento de forma rápida e armazená-los a uma temperatura superior ao seu ponto de congelação, geralmente, entre 0 e 3 °C, até ao seu consumo.¹⁶

2

Objectivos

2. Objectivos

2.1 Enquadramento e Justificação do Estudo

Existem na União Europeia critérios microbiológicos estabelecidos para alimentos específicos. Estes critérios aplicam-se ao longo de toda a cadeia alimentar, desde o produtor do alimento, às importações e a todo o comércio alimentar intra-comunitário. Tendo em conta estes critérios, os alimentos não devem conter microrganismos, toxinas e/ou metabolitos em quantidades que representem risco para a saúde humana.

O Regulamento (CE) nº 178/2002, de Janeiro de 2002, estabelece os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece os procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios, de acordo com os quais estes estão ou não aptos a ser comercializados.⁶ Os critérios microbiológicos para além de darem informação quanto à aceitabilidade dos géneros alimentícios, dão também orientações quanto aos seus processos de fabrico,

manuseamento e distribuição. Assim sendo, a utilização de critérios microbiológicos deve fazer parte integrante da elaboração e aplicação dos procedimentos baseados no sistema de HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point).⁷

No caso de pratos preparados, como é o caso deste estudo, os critérios estabelecidos, seguidos pela empresa Pascoal & Filhos S.A., estão sumariados na tabela 1. Segundo a fonte da qual foi retirada a informação, o Real Decreto 3484/2000 de 29 de Dezembro, os pratos preparados são divididos em 4 grupos (A, B, C e D): o grupo A corresponde a pratos sem tratamento térmico ou com tratamento térmico mas cuja formulação contém ingredientes não submetidos a tratamento térmico, o grupo B diz respeito a pratos com tratamento térmico, o C é o grupo onde figuram os pratos esterilizados e por fim o grupo D, no qual se inserem os pratos preparados e embalados à base de vegetais crus. A refeição em estudo neste trabalho insere-se no grupo B. Na tabela 2, encontram-se mais alguns dos limites, em termos de critérios microbiológicos, relevantes para este estudo.

Tabela 1. Critérios microbiológicos estabelecidos para pratos cozinhados.⁸

Microrganismo	Limites grupo B	
	m	M
Mesófilos a 30 °C (n=5, c=2)	10 ⁴ UFC/g	10 ⁵ UFC/g
Enterobactérias (n=5, c=2)	10 UFC/g	10 ² UFC/g
<i>Escherichia coli</i> (n=5, c=2)	0 UFC/g	10 UFC/g
<i>Salmonella</i> (n=5, c=0)	Ausência em 25g	
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=5, c=2)	10 UFC/g	10 ² UFC/g
<i>Listeria monocytogenes</i> (n=5, c=0)	Ausência em 25g	

m= valor inferior ao qual os produtos são considerados satisfatórios a nível de qualidade microbiológica

M= limiar máximo de aceitação de um produto

n= número de unidades que compõem a amostra

c= número de unidades da amostra em que foram obtidos valores entre m e M

Tabela 2. Critérios microbiológicos estabelecidos para alguns alimentos relevantes a este estudo.⁷

Alimento	Microrganismo	Plano de Amostragem		Limites		Método de Análise de Referência	Fase em que o critério se aplica	Medidas a adoptar
		n	c	m	M			
Carne picada	Número de colónias aeróbias	5	2	5x10 ⁵ UFC/g	5x10 ⁶ UFC/g	ISO 4833	Fim do processo de fabrico	Melhoria da higiene da produção e da selecção e/ou origem das matérias primas
	<i>E. coli</i>	5	2	50 UFC/g	500UFC/g	ISO 16649-1 ou 2		
Carne picada e preparados de carne, excepto os obtidos a partir de carne de aves de capoeira, destinados a serem consumidos cozinhados	<i>Salmonella</i>	5	0	Ausência em 10g		EN/ISSO 6579	Produtos colocados no mercado, durante o seu período de vida útil	
Frutas e produtos hortícolas pré-cortados (prontos para consumo)	<i>Salmonella</i>	5	0	Ausência em 25g		EN/ISSO 6579	Produtos colocados no mercado, durante o seu período de vida útil	
Alimentos prontos para consumo susceptíveis de permitir o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> , excepto os destinados a lactentes e fins medicinais específicos	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100UFC/g		EN/ISO 11290-2	Produtos colocados no mercado, durante o seu período de vida útil	
				Ausência em 25g		EN/ISO 11290-1	Antes do alimento deixar de estar sob o controlo imediato do operador da empresa do sector alimentar que o produz	

n= número de unidades que constituem a amostra;

c= número de unidades com valores superiores a M ou compreendidos entre m e M;

M= limiar máximo de aceitação de um produto;

m= valor inferior ao qual os produtos são considerados satisfatórios a nível de qualidade microbiológica.

Para que um produto apresente viabilidade sob o ponto de vista comercial, o produtor do mesmo tem de ser capaz de o produzir, de modo sistemático, com índices de segurança microbiológica aceitável.

Segundo estes critérios, um produto é considerado de qualidade microbiológica satisfatória se o número de UFC/g estiver abaixo do limite m estabelecido para o produto. Considera-se aceitável se as contagens microbianas estiverem compreendidas entre o valor de m e M e caso ultrapassem o limite M estabelecido o produto é considerado de qualidade não satisfatória.⁸ É neste âmbito que entra o conceito de vida útil de um alimento, o qual é baseado na sobrevivência e crescimento de microrganismos patogénicos e/ou deteriorativos. Daqui que um tempo de vida útil mal estimado possa colocar em risco a vida do consumidor.

Tendo em conta o aumento da procura de refeições pré-preparadas e tendo presente a necessidade do aumento do tempo de prateleira das mesmas, torna-se, cada vez mais pertinente, encontrar métodos simples e expeditos para determinar com confiança a validade dessas refeições.

A determinação da data limite de consumo de um determinado alimento é um ponto crítico na segurança do produto. Alimentos que, sob o ponto de vista microbiológico, são altamente perecíveis, e como tal susceptíveis de, após um curto período de tempo, constituir um perigo para a saúde pública, são os mais problemáticos e que requerem maiores cuidados no estabelecimento destes períodos de tempo. Assim a data limite de consumo estabelecida para determinado género alimentício, indica a data até à qual é garantido o consumo desse produto em segurança. É esta última que é aplicada aos alimentos preparados através do método “Cook-chill”.

Não existe nenhum sistema de atribuição de validade oficialmente recomendado, mas existe a obrigatoriedade a nível legal de mencionar no rótulo o prazo de validade.

2.2 Objectivos do Estudo

O presente estudo teve como principal objectivo analisar a evolução da carga microbiana de uma refeição preparada pelo método “Cook-chill”, tendo em conta a variação do tempo de espera ao qual a refeição é submetida, em diferentes etapas do seu

processamento, nomeadamente, entre o final da confecção e a selagem das cuvets e entre a selagem das cuvets e a redução rápida de temperatura.

Pretendia ainda verificar-se qual a influência do tempo de espera na evolução da carga microbiológica ao longo do tempo definido como tempo de prateleira para a refeição em causa.

O delineamento, na medida do possível, de um protocolo de análises genérico, de fácil aplicação, que permita fazer os mesmos estudos noutras refeições da empresa, preparadas pelo mesmo método, constituiu também um objectivo do presente estudo (instruções de trabalho em anexo).

A aplicação da microbiologia preditiva, no âmbito da utilização de programas disponíveis na Internet à refeição estudada, também foi alvo de estudo neste trabalho.

Por fim, procurou-se também compilar informação actual que sirva de suporte a possíveis estudos futuros.

3

Revisão Bibliográfica

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Conservação de Alimentos

Num sentido lato, a conservação de alimentos refere-se a qualquer medida que vise evitar a deterioração de alimentos. Num sentido mais estrito esta é aplicada a processos específicos que visam evitar a deterioração de alimentos causada por microrganismos ou fenómenos bioquímicos.

De uma forma genérica a conservação de alimentos depende, principalmente, da prevenção ou inibição do crescimento de microrganismos. Para se conseguir um aumento da vida útil de um alimento, deve incidir-se nos factores que influenciam eficientemente a sobrevivência e o crescimento microbiano. Estes factores, dependendo dos microrganismos presentes, podem ser predominantemente físicos, químicos ou microbianos.

Com excepção de alimentos esterilizados, todos os outros contêm microrganismos de vários géneros e em quantidade variável. Apesar disto, em alimentos processados, se forem seguidas as boas práticas de fabrico, os teores microbianos no produto final serão baixos.

Os microrganismos presentes num dado alimento processado dependem, não só da qualidade microbiológica das matérias-primas e do processamento por elas sofrido, mas também das condições de armazenamento, as quais devem ter como preocupação primordial manter as características do produto o maior tempo possível e evitar a multiplicação microbiana. Este último aspecto é de extrema importância por questões de saúde pública.²

3.1.1 Breve nota histórica

O uso do calor e do frio na conservação de alimentos remonta a épocas bastante antigas. Destes métodos físicos, o calor é sem dúvida o mais antigo, já que o aquecimento de alimentos através do fogo era mais fácil do que a produção de baixas temperaturas. Porém, sabe-se também que desde os tempos primitivos, em locais onde existisse gelo, este era usado como método de conservação.⁹

O conceito de processamento térmico de alimentos foi desenvolvido por Nicholas Appert, o qual recebeu do governo francês, em 1809, um prémio pelo desenvolvimento de um método de sucesso para a preservação de alimentos. O método em questão vulgarmente conhecido por “apertização” corresponde, actualmente, à esterilização comercial.¹⁰

As primeiras instalações refrigeradas surgiram em 1878 em Chicago (EUA), e foi em 1890 que se efectuou o primeiro transporte refrigerado, de barco (*Le Frigorifique*), no qual se fez o transporte de carne da Argentina para França. O frio doméstico teve início em 1910, verificando-se nas décadas de 50 e 60 uma banalização na venda de frigoríficos e congeladores nos Estados Unidos da América.

3.2 Tecnologias de Conservação de Alimentos

As várias formas de alteração microbiana podem ser evitadas através de técnicas de conservação que podem actuar através do impedimento ou restrição do crescimento de microrganismos, por inactivação dos microrganismos ou ainda através da restrição do acesso dos mesmos ao alimento, como processamento e embalagem em condições assépticas.

Desenvolvimentos mais recentes na conservação de alimentos resultaram na aplicação de técnicas como a alta-pressão, electroporação, mano-termo-sonicação e adição de enzimas bacteriolíticas. Na tabela 3 encontram-se, de forma sumariada, exemplos das técnicas acima mencionadas, de acordo com a sua base de actuação.

Tabela 3. Exemplos de técnicas anti-microbianas empregues na preservação de alimentos. ¹¹

Objectivo	Base da conservação	Método aplicado
Redução ou inibição do crescimento de microrganismos	Valores baixos de temperatura	Refrigeração e Congelação
	Valores de actividade da água baixos	Seca, cura e adição de sal
	Restrição de nutrientes	Emulsões água em óleo
	Reduzidas concentrações de oxigénio	Embalagem em azoto ou em vácuo
	Elevadas concentrações de dióxido de carbono	Embalagem em atmosfera protectora
	Acidificação	Adição de ácidos, fermentação
	Fermentação alcoólica	Processos de vinificação, produção de cerveja
Inactivação dos microrganismos	Uso de conservantes	Adição de conservantes: inorgânicos (sulfitos, nitritos); orgânicos (propionatos, sorbatos, benzoatos, parabenos); antibióticos (nisina, natamicina)
	Alta temperatura	Pasteurização e esterilização
	Irradiação	Radiação ionizante
	Pressurização	Aplicação de alta pressão hidrostática
	Electroporação	Descarga eléctrica de alta voltagem
	Mano-termo-sonicação	Aquecimento com ultra-sonicação a pressão elevada
	Lise celular	Adição de enzimas bacteriolíticas (lisozima)
Restrição do acesso dos microrganismos ao alimento		Processamento e embalagem em condições assépticas

Destas técnicas as mais utilizadas são a redução de temperatura, a diminuição do pH, diminuição da actividade da água e a aplicação de calor. Actualmente a aplicação destas e de outras técnicas de conservação de forma conjunta – tecnologia de barreiras – tem ganho muito relevo.¹²

3.2.1 Refrigeração de Alimentos

O princípio de actuação da conservação pelo frio baseia-se no facto dos processos físicos, químicos, biológicos e microbiológicos estarem intimamente ligados à temperatura. A velocidade destes tem tendência a diminuir com a descida da temperatura.

Tendo em conta aspectos fisiológicos e sensoriais dos alimentos, a conservação pelo frio apresenta inúmeras vantagens face a outras técnicas de conservação, nomeadamente, a menor perda de alguns constituintes (p. ex.: ácido ascórbico) em relação a outras técnicas como a esterilização ou a liofilização.

No que se refere às alterações químicas provocadas pelas baixas temperaturas, sabe-se que a maioria dos processos químicos e bioquímicos, como o descrito por van'T Hoff, ocorrem, na faixa de temperaturas entre -30 e 30 °C, e um decréscimo de temperatura de 10 K ocasiona uma diminuição da velocidade da reacção para cerca de metade ou um terço da velocidade inicial da mesma. Deste modo o prazo de armazenamento de um determinado alimento pode ser prolongado de forma mais ou menos proporcional. O crescimento e multiplicação microbiana têm por base reacções bioquímicas complexas, o que explica que, de um modo geral, o crescimento microbiano diminua com a diminuição da temperatura (figura 1). Com a diminuição da temperatura dá-se um aumento na extensão da fase lag da curva de crescimento dos microrganismos, e a velocidade de crescimento da fase que se segue, a fase exponencial, diminui.¹³

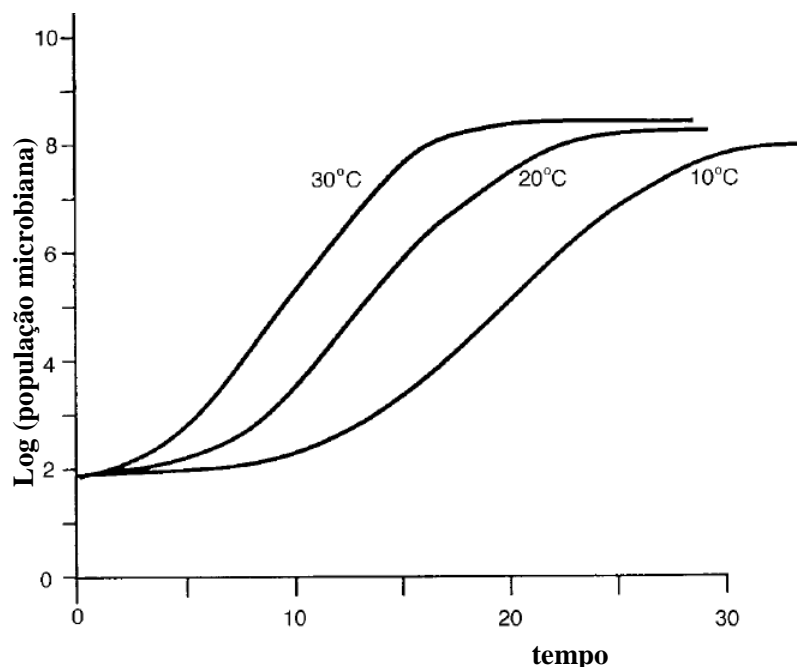


Figura 1. Aumento da duração da fase lag com a diminuição da temperatura.¹³

O armazenamento refrigerado, é feito normalmente a temperaturas entre -3 e 4 °C, com uma humidade relativa de ar entre 70 a 95% e com uma velocidade de ar que ronda os 0,3 – 0,8 m/s, considerando que os valores óptimos a adoptar dependem do tipo de produto.¹⁴ Na tabela 4 apresentam-se condições óptimas de armazenamento refrigerado para alimentos distintos. Apesar do presente estudo não se centrar neste género de alimentos, a indicação é feita a título de exemplo, afim de se verificar a relação entre as condições de refrigeração e a sua relação com a matriz do alimento e o tempo de armazenamento conseguido.

Tabela 4. Condições óptimas de armazenamento refrigerado para alimentos distintos.¹⁵

Alimento	Temperatura (°C)	Humidade relativa (%)	Armazenamento (semanas)
Maçãs	0 a 4	90 a 95	24 a 32
Peras	-1 a 0	87 a 92	24
Laranjas	4 a 5	90	10 a 16
Uvas	-2 a 0	85	3 a 6
Tomates	1,5 a 2	90 a 95	3 a 5
Cebolas	-2,5 a -2	75 a 80	36
Carne de vaca	-1,5 a 0	90	3 a 5
Aves	-1 a 0	85 a 90	1 a 1,5
Ovos	0 a 1	75 a 85	24 a 28
Couve-flor	-0,5	90 a 95	4 a 8

3.3 *Microrganismos com capacidade de crescimento abaixo de 5 °C*

Este tipo de microrganismos constitui uma grande preocupação, uma vez que têm capacidade de crescer mesmo que haja uma boa refrigeração e não existam quebras na cadeia do frio. O controlo da temperatura é um factor crítico, já que a diminuição da temperatura pode levar a que a velocidade de crescimento destes microrganismos aumente, ainda que lentamente.¹³

3.3.1 *Listeria monocytogenes*

Reconhecida como um patogénico em 1926, a sua ligação com as doenças alimentares só foi reconhecida efectivamente no final dos anos 70. Representa um grande desafio na medida em que tem uma temperatura mínima de crescimento de -0.4 °C, podendo por isso crescer de forma satisfatória a temperaturas de refrigeração.

A sua presença já foi reportada numa grande variedade de alimentos como, carnes, aves, produtos lácteos, alimentos de origem marinha e vegetais, podendo considerar-se por isso que tem uma distribuição ubíqua no ambiente.

O controlo da presença de *Listeria* em etapas específicas do processamento de alimentos cozinhados, pode ser uma medida para garantir a sua ausência no produto final. Locais e/ou etapas onde a água esteja presente devem ser de especial atenção. Não é considerada como um microrganismo muito resistente à temperatura, sendo que, no caso do leite, por exemplo, o tratamento normal de HTST (High Temperature Short Time) (71.7 °C/15 segundos) é suficiente para a eliminação deste patogénico. Nos alimentos submetidos ao método “Cook-chill” a temperatura mínima de 70 °C durante um mínimo de 2 minutos, apresenta-se como viável para a eliminação efectiva deste microrganismo. Apesar disto, o isolamento deste patogénico neste tipo de produtos já foi verificado, o que sugere a ocorrência de contaminação pós-processamento, facto a ter em atenção, para a necessidade de adopção de boas práticas de higiene e manipulação dos produtos.¹³

3.3.2 *Yersinia enterocolitica*

A temperatura mínima de crescimento registada para este microrganismo é de -1.3 °C, sendo que esta bactéria cresce relativamente bem às temperaturas características usadas no método “Cook-chill”. Tal como a *L. monocytogenes*, uma redução na temperatura de armazenamento causa um aumento drástico no crescimento da *Y. enterocolitica*. Este é um patogénico sensível ao calor, pelo que a sua eliminação é conseguida através de processamentos térmicos adequados. No entanto a sua presença em alimentos cozinhados e produtos lácteos pasteurizados já foi verificada, o que mais uma vez sugere a contaminação pós-processamento como um factor muito relevante.¹³

3.3.3 *Aeromonas hydrophila*

Tem uma temperatura mínima de crescimento que ronda -0.1 a 1.2 °C, tal como os microrganismos psicrotróficos referidos anteriormente, o controlo da temperatura deve ser

de especial atenção para minimizar o seu crescimento. Existe ainda pouca informação quanto à sua resistência térmica, mas é tida como sensível à temperatura, eliminando-se por isso dos alimentos com facilidade, se estes forem sujeitos a processamento térmico adequado.¹³

3.3.4 *Bacillus cereus*

O papel deste microrganismo na deterioração dos produtos “Cook-chill” é largamente reconhecido devido à sua capacidade de crescer a temperaturas inferiores a 1 °C. A par dos efeitos deteriorativos pode também causar doenças, ainda que o número de casos reportados seja baixo. Nestes casos, as temperaturas requeridas para o crescimento são entre 10 – 15 °C, ainda que existam casos de estudo em leite pasteurizado, por exemplo, em que se verificou crescimento e produção de toxinas a uma temperatura de 4 °C. Se existirem abusos de temperatura, o tempo necessário para a detecção da presença de toxinas diminui cerca de 50% quando a temperatura é mantida entre 4 e 7 °C. O controlo da presença de *B. cereus* tem grande importância em alimentos submetidos a tratamentos térmicos, uma vez que este tratamento elimina possíveis microrganismos competidores e, como os esporos deste microrganismo resistem ao calor, podem posteriormente germinar e crescer aquando do armazenamento refrigerado.¹³

3.3.5 *Clostridium botulinum*

C. botulinum é um microrganismo anaeróbio, Gram positivo, formador de esporos e que produz proteínas neurotóxicas. É responsável pelo botulismo, uma doença neuromuscular bastante grave e na maioria dos casos fatal. Existem pelo menos três grupos distintos de *C. botulinum*, os quais diferem na capacidade de produzir toxinas (tipos de toxinas: A, B, C, D, E, F e G). Estes grupos podem ser diferenciados com base nas suas características bioquímicas e fisiológicas. Os tipos A, B, E e F são patogénicos para os humanos e podem ser divididos em dois grupos, os proteolíticos e os não proteolíticos. Os proteolíticos são resistentes ao calor e tolerantes ao sal. Os não proteolíticos, são sensíveis

ao aumento da temperatura e à presença de sal. Na tabela 5 estão as comparações entre estes dois tipos.

Tabela 5. Comparação dos tipos proteolítico e não proteolítico de *Clostridium botulinum*.¹³

	<i>C. botulinum</i> proteolítico	<i>C. botulinum</i> não proteolítico
Temperatura mínima	10-12 °C	3.3-5.0 °C
pH mínimo	4.6	5.0
Sal máximo	10%	5-6.5%
a _w mínima	0.93	0.95-0.97
Valor de D a 100°C para os esporos	25 minutos	< 0.1 minutos

Estudos indicaram que os tipos não proteolíticos B, E e F são capazes de crescer e produzir toxinas abaixo de 5 °C ou menos. Logo a maior preocupação reside nos não proteolíticos no que se refere a alimentos “Cook-chill”, com valores de pH baixos. Uma forma de garantir a segurança é submeter os alimentos a um binómio tempo - temperatura adequado durante o seu processamento. Alimentos embalados em atmosferas modificadas, com baixas concentrações de oxigénio apresentam-se como mais susceptíveis.¹³

3.4 Método “Cook-chill”

O método “Cook-chill”, numa tradução literal do inglês, significa “cozinhar-arrefecer”. Este é um sistema de produção de refeições onde se promove uma descontinuidade entre a produção e o momento de utilização, por intermédio de um processo de arrefecimento rápido dos alimentos. O método “Cook-chill” consiste no confeccionar dos alimentos, proceder ao seu arrefecimento de forma rápida e armazená-los a uma temperatura superior ao seu ponto de congelação, geralmente, entre 0 e 3 °C, até ao seu consumo.¹⁶ Este intervalo de temperatura deve ser respeitado, não só por questões de segurança microbiológica, mas também porque se estes produtos forem submetidos a temperaturas que permitam a congelação perdem qualidade.⁹

O processo de refrigeração deve começar logo após o término da preparação e doseamento dos produtos e deve ser feito de forma rápida, de modo a garantir a qualidade microbiológica dos mesmos, mantendo-os o menor tempo possível na gama de temperaturas de risco (5 a 63 °C). Nesta etapa é fundamental a adopção de práticas de manipulação higiénicas, prevenindo assim a recontaminação do produto.

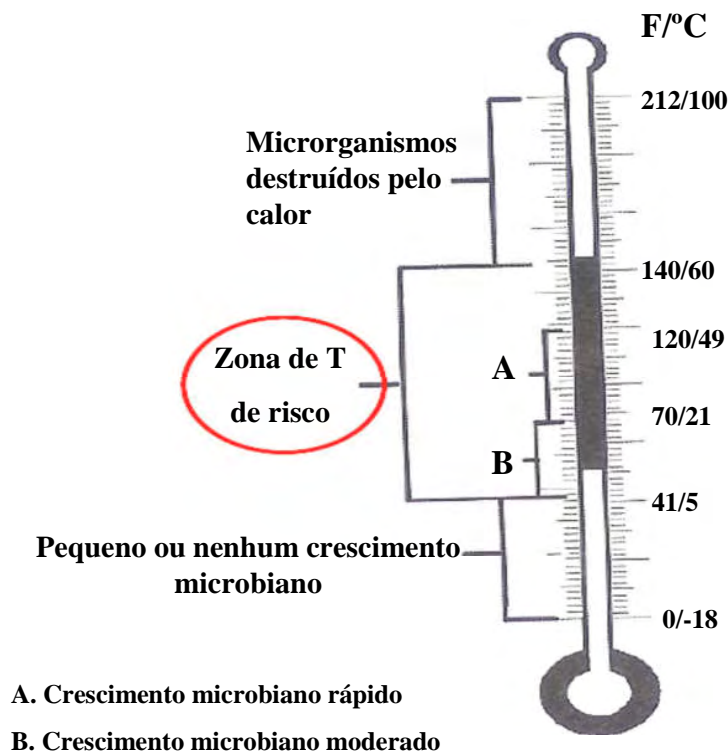


Figura 2. Efeito da temperatura no crescimento microbiano. ¹⁷

A refrigeração é um importante obstáculo para retardar ou inibir a proliferação da flora patogénica e deteriorativa, uma vez que o tratamento térmico sofrido pelos produtos submetidos ao método “Cook-chill” não é suficiente para garantir a sua esterilidade comercial. Na tabela 6 estão indicadas temperaturas estipuladas pelas legislações de alguns países da União Europeia para o armazenamento refrigerado de produtos “Cook-chill”. ¹⁸

Tabela 6. Exemplos de temperaturas de refrigeração estipuladas pela legislação de alguns países da União Europeia.¹⁸

País	Temperatura para o armazenamento (°C)
Bélgica	Máximo de 7 °C
Dinamarca	5 °C
Finlândia	Produtos à base de carne: 6°C; outros produtos 8 °C
França	Depende da etapa, p. ex. no ponto de venda o armazenamento deve ser ≤ 4 °C
Itália	Produtos cárneos: -1 a 7 °C; produtos de pesca: 0 a 4 °C
Espanha	0– 3 °C
Suécia	< 8 °C
Holanda	Máximo de 7 °C
Reino Unido	Máximo de 8 °C
Portugal	0– 3 °C

O sucesso deste método de preparação de alimentos, reside no facto das temperaturas a que as preparações são submetidas, apesar de não muito elevadas, resultarem na inactivação das formas microbianas vegetativas. Associado a este facto, está a maior susceptibilidade à elevação da temperatura dos esporos das bactérias psicrotróficas, relativamente aos das bactérias mesófilas e termófilas, o que é importante dado que estes produtos são armazenados sob refrigeração.¹¹

É importante ter presente que a refrigeração diminui a velocidade com que ocorre a deterioração, não a elimina por completo nem melhora a qualidade de produtos se estes forem de baixa qualidade inicialmente.⁹

Na figura 3 está representado o fluxograma típico de um alimento preparado pelo método “Cook-chill”, incluindo a refeição em estudo.

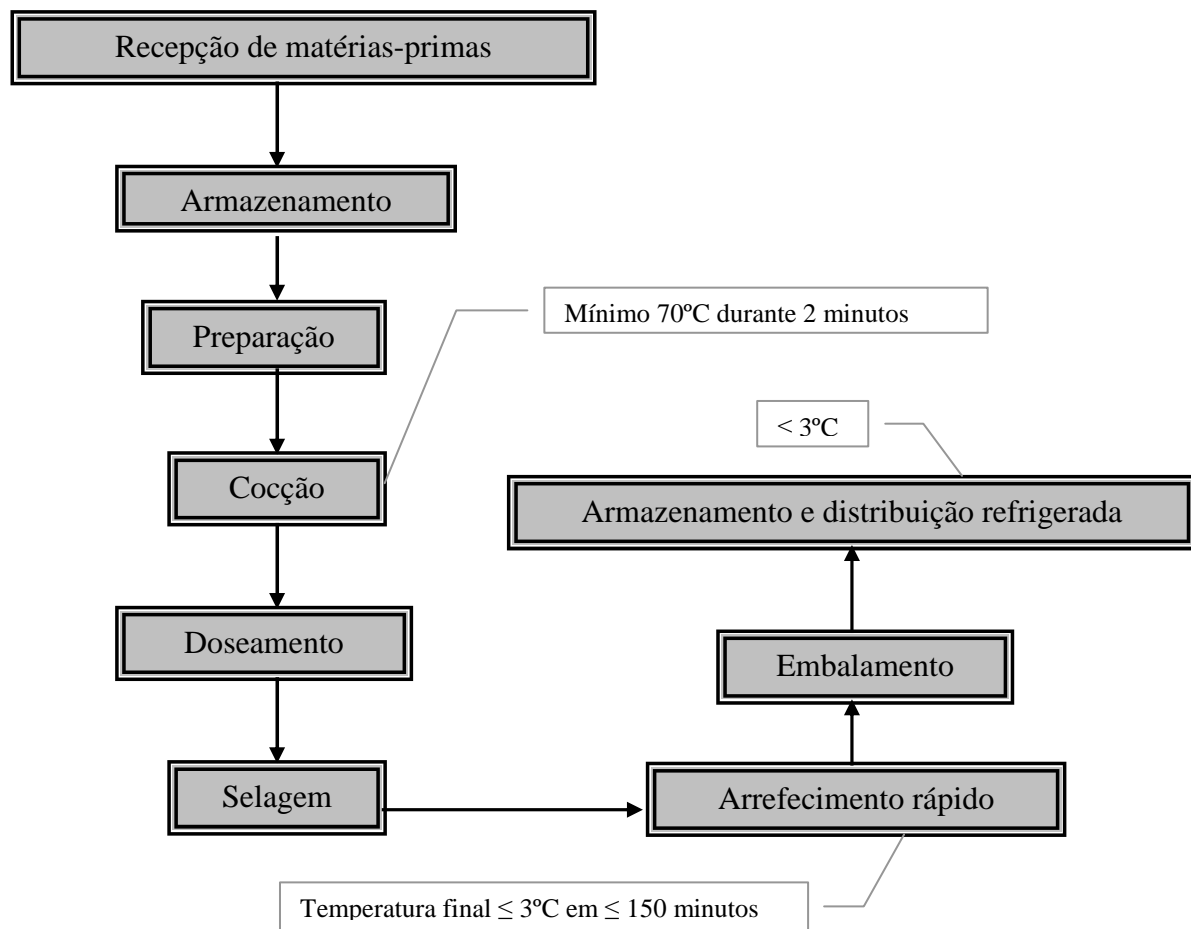


Figura 3. Fluxograma representativo do método “Cook-Chill” (Adaptado de Food Safety Authority of Ireland, 2006).¹⁶

O sistema “cook-chill” assenta nos seguintes princípios fundamentais:

1. Todas as matérias-primas utilizadas nas preparações devem ser de boa qualidade;
2. Os processos de confecção deverão assegurar a destruição da grande parte da carga microbiológica, nomeadamente das formas vegetativas;
3. O arrefecimento rápido, ao qual as preparações são submetidas, deverá controlar o crescimento dos microrganismos;
4. Deve evitar-se a contaminação cruzada, nomeadamente, entre os alimentos crus e confeccionados;
5. O armazenamento refrigerado deverá ser feito de modo a manter a qualidade e segurança alimentar dos produtos;

6. A regeneração (recuperação da temperatura de consumo) deverá igualmente manter a qualidade e segurança alimentar dos alimentos preparados.

A implementação deste método apresenta um grande conjunto de vantagens das quais se salientam: a adequação a todos os tipos de restauração; a melhor gestão do tempo, devido à concentração da produção nos períodos mais convenientes; a possibilidade de alargamento da oferta, mantendo a capacidade operacional de resposta; a melhoria na qualidade global, uma vez que a separação entre as etapas de produção e de consumo, possibilitam que se tenha um maior cuidado na produção e no acabamento dos produtos, bem como os requisitos de higiene alimentar e as boas práticas de fabrico.

Apesar do referido, o sucesso da implementação deste método de produção de alimentos pode encontrar problemas, dos quais se destacam: desconfiças por parte dos consumidores; falta de conhecimentos na utilização da tecnologia; más práticas de “regeneração” das refeições; desfasamento temporal entre a produção e o consumo, que implicam um maior cuidado a nível de segurança alimentar e, apesar das temperaturas usadas na cocção não serem demasiado elevadas, podem verificar-se algumas perdas nutricionais, com especial atenção para a possível perda de vitaminas.¹⁶

3.5 Tempo de Vida Útil

O tempo de vida útil define-se como o período de tempo que o alimento permanece estável e mantém todas as características desejáveis, incluindo a segurança a nível microbiológico.¹⁹ É referido, também, como o período de tempo ao fim do qual são percebidas diferenças significativas e inaceitáveis nas características definidas para um determinado produto.²⁰ Estas diferenças podem ser em parâmetros microbiológicos, químicos, físicos ou diferenças detectadas ao nível da análise sensorial do alimento.

Com o passar do tempo a deterioração dos alimentos é inevitável, esta é atribuída, principalmente, a alterações ocorridas durante o armazenamento. As alterações físicas devem-se a operações que o alimento é sujeito durante o processamento. No que se refere às alterações químicas, estas têm como causa principal a actividade enzimática, a qual é altamente dependente da temperatura, aumentando com o incremento desta. O oxigénio

disponível assim como a água e o valor de pH influenciam por sua vez, não só a actividade enzimática como a actividade microbiana.²¹

Alguns dos principais factores que contribuem para a deterioração dos alimentos e consequentemente para a redução do tempo de vida útil são mencionados de seguida:

1. Enzimas endógenas, nos frutos e vegetais causam a oxidação de compostos fenólicos (browning enzimático) e promovem a degradação das pectinas (amolecimento);
2. Infestações de insectos e/ou roedores;
3. Parasitas, principalmente em carnes e peixe;
4. Microrganismos (bactérias, fungos e bolores);
5. Exposição à luz, pode levar à degradação de pigmentos, gorduras e proteínas, originando sabores desagradáveis (off-flavours) ou por outro lado à produção de pigmentos que conferem tonalidades desagradáveis ao alimento;
6. Temperaturas elevadas ou reduzidas em demasia, podem levar à alteração da textura do alimento de forma indesejável (destruição de emulsões por exemplo);
7. Exposição ao ar, principalmente ao oxigénio, leva à oxidação de lípidos, responsável pela produção de sabores e odores indesejáveis extremamente fortes;
8. Efeito da matriz, é extremamente importante o tipo de alimento em questão.

Estes factores devem ser interpretados como estando relacionados entre si, isto porque combinações entre determinadas temperaturas, disponibilidade de oxigénio e o tipo de matriz do alimento, podem incrementar ou inibir a acção de determinadas enzimas endógenas ou a acção de microrganismos. Infestações de insectos e/ou roedores levam, regra geral, a um incremento na existência e actividade de microrganismos.¹⁹

Visto isto, o tempo de vida útil dos produtos refrigerados, como é o caso do estudo feito no presente trabalho, é condicionado pela interacção entre vários factores, dos quais se destacam a qualidade das matérias-primas, a formulação do produto, as condições higio-sanitárias durante a produção, a severidade do processo aplicado no processamento, temperatura de armazenamento, número e tipo de microrganismos tolerantes a baixas temperaturas, material da embalagem e composição da atmosfera envolvente.

Nos alimentos refrigerados, a flora microbiana preocupante divide-se em dois grupos, os microrganismos psicrótróficos e os mesófilos, que podem multiplicar-se,

atingindo níveis preocupantes para a saúde, durante longos períodos de refrigeração ou devido a falhas na cadeia do frio. Os microrganismos psicrotróficos caracterizam-se por crescerem, ainda que de forma lenta, a temperaturas de refrigeração (abaixo dos 7 °C), mas que tem o seu óptimo de crescimento a temperaturas superiores, na ordem dos 25-30 °C. Os microrganismos mesófilos podem sobreviver às temperaturas empregues na refrigeração e multiplicar-se caso haja abusos de temperatura. Estes crescem entre os 20-45 °C, sendo que o seu óptimo ronda os 30-40 °C. A preocupação com estes dois grupos de microrganismos não se resume aos patogénicos, a possibilidade de microrganismos deteriorativos se multiplicarem durante longos períodos de armazenamento refrigerado e assim afectarem a qualidade organoléptica do alimento, constitui também um motivo de preocupação na indústria alimentar.²²

Estudos mostram que o número de microrganismos psicrotróficos é menor quando os alimentos são armazenados em atmosferas com elevada concentração de CO₂, e que existe um grande número de microrganismos patogénicos com capacidade de crescer a temperaturas de refrigeração. Estes incluem: *A. hydrophila*, algumas estirpes de *B. cereus*, *Listeria* spp, *Y. enterocolitica*, *E. Coli* enteropatogénica e *Vibrio parahaemolyticus*. A presença de *L. monocytogenes*, devido à distribuição ubíqua no ambiente, patogenicidade com elevado grau de mortalidade, resistência e crescimento lento a baixas temperaturas, apresenta-se como uma das maiores preocupações. Em produtos embalados com baixas concentrações de oxigénio disponível, deve considerar-se a presença potencial de *C. botulinum*, devido aos seus esporos.²¹

Tabela 7. Valores de alguns dos parâmetros relacionados com o crescimento da *Listeria monocytogenes*, que explicam parte da sua resistência.²³

Parâmetros	<i>Listeria monocytogenes</i>
T _{mínima}	-0.4 °C
T _{ótima}	37 °C
pH _{mínimo}	4.3
pH _{ótimo}	7.0
a _w mínima	0.92

Apesar do controlo da temperatura nos produtos refrigerados se apresentar como o parâmetro de maior impacto na estabilidade e manutenção da segurança deste género de produtos, a AFDOS (Association of Food & Drug Officials) e outras organizações como a NFPA (National Food Processor's Association, EUA) recomendam a utilização de barreiras secundárias de inibição do crescimento microbiano para além da embalagem com reduzida quantidade de oxigénio e do controlo da temperatura. Estas recomendações incluem, valores de actividade de água (a_w) < 0.91, valores de pH < 4.6 e quando possível, o emprego de floras microbianas não patogénicas, afim de competirem com a flora patogénica.²⁴ Na figura 4 está representado um exemplo da tecnologia de barreiras com possíveis barreiras a adoptar para diminuir a velocidade de crescimento de microrganismos.

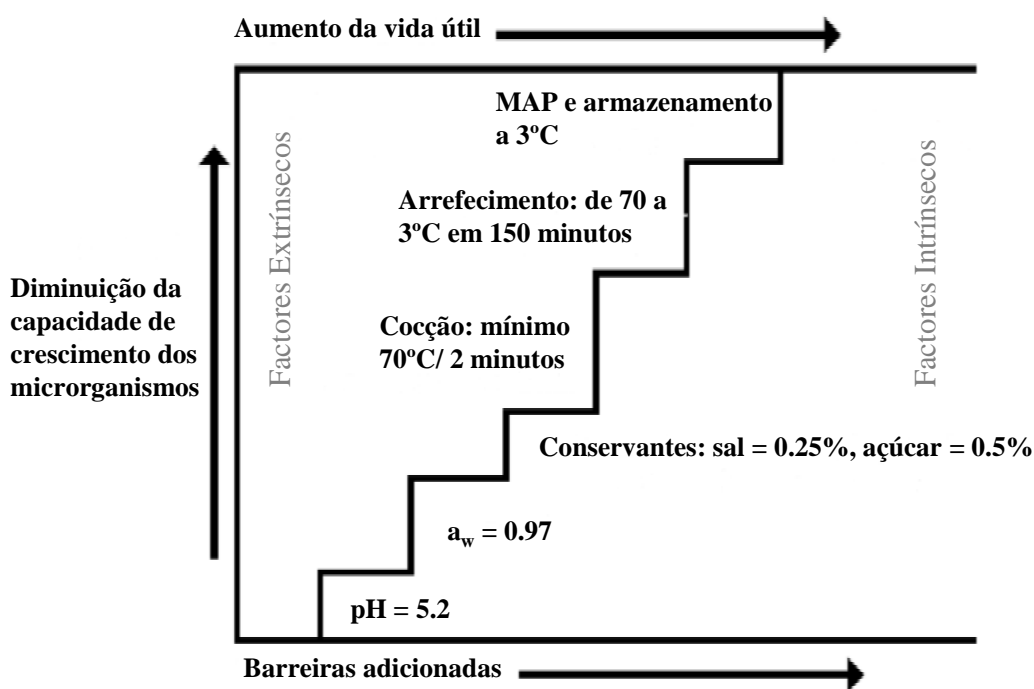


Figura 4. Esquema representativo da tecnologia de barreiras.²⁵

Como se pode verificar pelo esquema, à medida que mais barreiras vão sendo adicionadas a capacidade dos microrganismos para sobreviverem e se multiplicarem vai diminuindo. Nem todas as barreiras têm o mesmo efeito nos microrganismos, podendo umas actuar sobre um tipo de microrganismo e outras não ou tendo um efeito mais efectivo umas em relação às outras.

3.6 *Microorganismos nos Alimentos*

Os problemas causados pela alteração de alimentos e pelas infecções e intoxicações alimentares causadas por microrganismos são uma realidade que tem acompanhado o Homem ao longo da sua evolução. Os alimentos apresentam-se como um excelente meio de cultura para microrganismos, figurando como potenciais meios de transmissão dos mesmos.

Dependendo do tipo de alimento assim como do tipo de microrganismo presente, a multiplicação microbiana pode resultar na conservação ou na deterioração do alimento. Da transformação do alimento cru levada a cabo por microrganismos podem resultar produtos apreciados, como queijos, pickles e produtos de salsicharia. É também da actividade de microrganismos que resultam produtos como o vinho, a cerveja e outras bebidas alcoólicas. Logo, a presença de microrganismos nos alimentos nem sempre é prejudicial.²

3.6.1 *Crescimento microbiano*

Quando os microrganismos se encontram num ambiente não limitante em termos de nutrientes, como é o caso da maior parte dos alimentos, e em condições ambientais favoráveis, reproduzem-se aumentando de forma acentuada o seu número. Esta mudança no número de microrganismos é dada pelas curvas de crescimento microbiano, nas quais é representada a variação do número de microrganismos em função do tempo, tendo em conta a influência de factores intrínsecos e/ou extrínsecos, dado que se apresentam como condições que ditam a sobrevivência, crescimento e controlo sobre os microrganismos desejáveis e/ou indesejáveis nos alimentos.

Normalmente o método tradicional para o estudo do crescimento microbiano é através de culturas em descontinuo ou sistema fechado (*batch*). Considerando um meio adequado em termos de fonte de energia, nutrientes, condições físicas e químicas favoráveis, o crescimento dos microrganismos é dado pela representação gráfica do Log (UFC/g) em função do tempo, e este é geralmente caracterizado por 4 fases distintas.²⁶

Na figura 5 encontra-se a representação de uma curva típica de crescimento microbiano confinado.

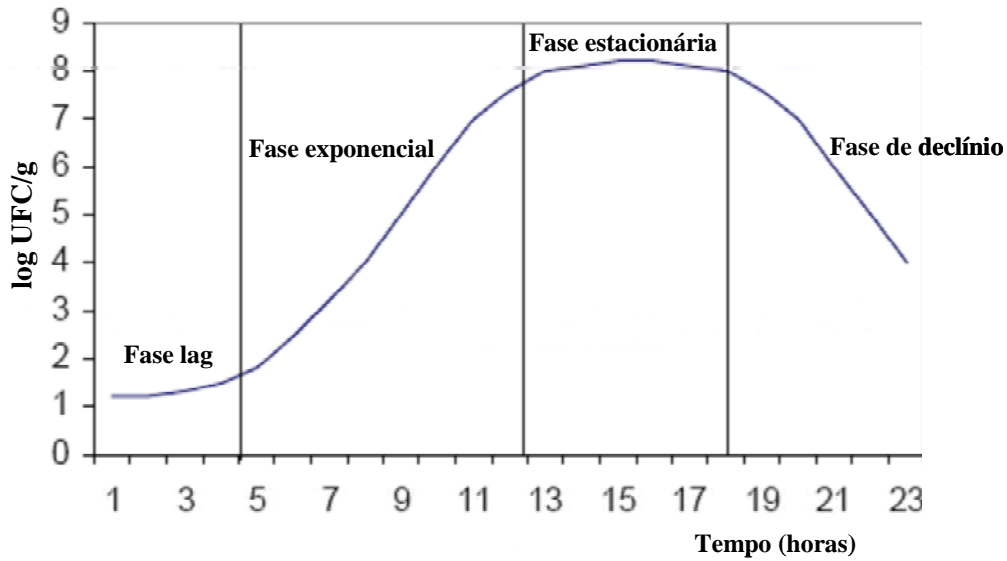


Figura 5. Curva de crescimento microbiano.²⁷

Como se pode ver na figura 5 distinguem 4 fases, a fase lag, caracterizada por não se verificar crescimento e diz respeito a uma fase de adaptação em termos de ajuste fisiológico e bioquímico dos microrganismos ao ambiente. Segue-se a fase exponencial (log), nesta as células microbianas reproduzem-se tão rápido quanto possível a uma velocidade constante. O valor da taxa específica de crescimento (μ), mantém-se constante, atingindo o seu valor máximo ($\mu = \mu_{\max}$), e corresponde ao declive da recta que define o crescimento nesta fase. Após esta fase de crescimento exponencial, devido ao esgotar de nutrientes no meio e/ou o acumular de metabolitos dos microrganismos, os quais podem ser inibitórios, verifica-se o cessar da divisão dos microrganismos, entrando então numa fase estacionária. Após esta fase, devido ao excesso de metabolitos tóxicos e/ou à autólise das células por enzimas líticas, ocorre a morte das células, que é definida pela perda irreversível da capacidade destas se dividirem, o que resulta no decréscimo da população viável, fase denominada de declínio ou morte.²⁸ Para a microbiologia alimentar a velocidade das fases lag e log (exponencial) são as mais relevantes.²⁹

3.6.2 Características dos Alimentos que Condicionam o Crescimento Microbiano

3.6.2.1 Factores Intrínsecos

O comportamento dos microrganismos nos alimentos: crescimento, sobrevivência e morte, é condicionado por parâmetros que podem ser categorizados como factores intrínsecos ou extrínsecos.

Os factores intrínsecos dizem respeito às características do próprio alimento ou produto, nos quais se incluem: a actividade da água (a_w), o pH e a acidez total, o potencial redox (E^0), a disponibilidade ou não de oxigénio, nutrientes, a microflora natural e a sobrevivente após processamento, a bioquímica do próprio alimento (enzimas, compostos químicos) e o uso de qualquer agente conservante na formulação do produto (por exemplo de sal). Estes factores são influenciados em grande escala pelo tipo e qualidade das matérias-primas e pela formulação e estrutura do produto final.^{1, 27}

O pH influencia o crescimento dos microrganismos, na medida em que interfere em dois aspectos fundamentais, nomeadamente, no funcionamento das enzimas responsáveis pela respiração e no transporte de nutrientes para o interior das células. Sabe-se que a maioria dos microrganismos tem um crescimento óptimo por volta de pH 7 (6.5-7.5) e que poucos conseguem crescer a valores inferiores a 4 (figura 6). Por exemplo, a maioria dos vegetais possui um pH mais elevado que os frutos o que os torna, consequentemente, mais susceptíveis ao ataque microbiano.¹

Alguns alimentos como frutos, vinagre e algumas bebidas têm a sua conservação em grande parte promovida, pelo facto do seu pH se situar abaixo dos valores a que as bactérias se multiplicam, sendo neste caso a flora fúngica a mais problemática. Os bolores e as leveduras são mais comuns no ataque a frutos já que o seu desenvolvimento é favorecido por pHs baixos.³⁰

No caso das carnes e do peixe que têm pHs na ordem de 5.6, são muito susceptíveis ao ataque por bactérias, sendo que os animais e peixes cuja morte ocorreu em situação de stress são mais problemáticos, o que tem a sua causa directa do pH final atingido no *rigor mortis*.³¹

A maior ou menor percepção na deterioração de alimentos depende também da capacidade dos mesmos para resistir às mudanças de pH provocadas pelo crescimento de

microrganismos. Geralmente as carnes tem maior capacidade para actuar como tampão que os vegetais, facto explicado pela sua maior quantidade de proteínas.

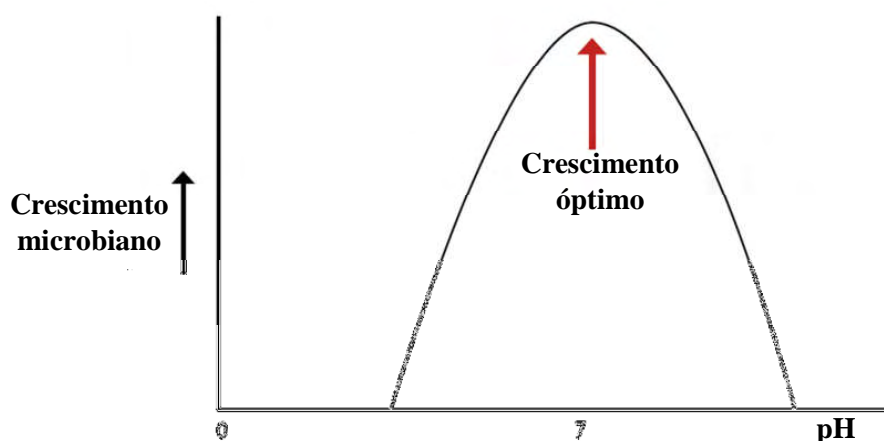


Figura 6. Representação esquemática da viabilidade do crescimento dos microrganismos consoante o valor do pH da matriz em que estes se encontram.²⁵

Outro factor muito relevante na conservação de alimentos é a actividade da água, que é definida pela razão entre a pressão de vapor de água no alimento (p) e a pressão de vapor de água pura (p_0) à mesma temperatura ($a_w = p/p_0$).^{2, 32} A actividade da água é a medida da quantidade de água de um alimento que se encontra disponível para ser utilizada por microrganismos, incluindo os patogénicos e em reacções bioquímicas. Uma a_w de 0.85 ou inferior a este valor previne o crescimento e a produção de toxinas por parte dos microrganismos patogénicos, incluindo *S. aureus* e *C. botulinum*.²⁴

Nos alimentos frescos a actividade da água é geralmente elevada, na ordem dos 0,99, o que torna estes produtos muito susceptíveis à deterioração.

Em termos de exigências dos microrganismos sabe-se que as bactérias exigem valores de a_w superiores aos requeridos pelos fungos, dentro destas as Gram negativas apresentam maiores exigências que as Gram positivas.

De um modo geral o abaixamento da actividade da água é traduzido num aumento da fase lag (fase de latência), numa diminuição da taxa de crescimento e consequentemente num decréscimo da população microbiana final.

Na tabela 8, estão alguns exemplos de microrganismos e respectivas exigências dos mesmos com relação aos parâmetros referenciados.

Tabela 8. Condições de temperatura, pH, a_w e concentração de sal necessárias ao crescimento de alguns microrganismos. ¹⁶

Microrganismo	T mín. (°C)	pH mín.	a_w (mín.)	Sal (%solução aquosa) (Max.)	Alimentos associados
<i>Salmonella spp</i> ¹	5.2	3.8	0.94	4.0	Ovos, aves, carnes
<i>Clostridium botulinum</i> ² Mesófilo/proteolítico (tipo A, B e F)	10	4.6	0.93	10.0	Carne, aves, molhos, legumes cozidos
<i>Clostridium botulinum</i> ² Psicotrófico/não proteolítico (tipo B, E e F)	3.3	4.8	0.97	5.0	Carne, aves, molhos, legumes cozidos
<i>Staphylococcus aureus</i> ¹	6.0 ⁵	4.5	0.83 ⁵	7.5	Queijo, salame, massa, vegetais e peixe
<i>Campylobacter jejuni</i> ³	25	4.9	0.98	2.0	Aves, carnes e produtos lácteos
<i>Yersinia enterocolitica</i> ¹	-1.3	4.2	0.94	7.0	Carnes frescas e leite
<i>Listeria monocytogenes</i> ^{1,7}	-0.4	4.3	0.92	12.0	Chilled foods
<i>Clostridium perfringens</i> ²	10	5.0	0.93	6.0	Carne cozinhada e aves
<i>Escherichia coli</i> O157 e VTEC ^{1,4}	6.5	4.0	0.95	8.0	Carne, aves, leite e produtos vegetais
<i>Bacillus cereus</i> ¹	4.0	4.3	0.92	7.5	Arroz cozinhado e especiarias
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ¹	5.0	4.8	0.94	8.0	Peixe e produtos marinhos

¹ Crescem com ou sem presença d oxigénio (anaeróbios facultativos)² Requerem ausência de oxigénio para crescerem (anaeróbios)³ Requerem níveis limite de oxigénio para crescerem (microaerófilos)⁴ (VTEC): Verotoxigenic *Escherichia coli*⁵ Somente para crescimento: temperatura de 6 °C e $a_w \geq 0.83$, para produção de toxinas: temperatura de 10°C e $a_w \geq 0.85$ ⁶ A a_w mínima para o crescimento é geralmente determinada por adição de sal. O mínimo para crescimento com outras substâncias (p.e. açúcares) é diferente. Para a produção de toxinas o mínimo de a_w requerido é, geralmente, superior.⁷ Geralmente, as refeições prontas a comer (ready-meals) com um valor de $pH \leq 4.3$ ou $a_w \leq 0.92$, ou $pH \leq 5.0$ e $a_w \leq 0.94$ consideram-se inviáveis para o crescimento de *Listeria monocytogenes*.

Com influência no crescimento de microrganismos temos ainda o potencial de oxidação-redução (E^0). Este diz respeito à maior ou menor facilidade com que o produto alimentar ganha ou perde electrões. O valor de E^0 a que o microrganismo cresce determina a medida em que este necessita de oxigénio ou não para crescer. Podem classificar-se os microrganismos tendo em conta as suas necessidades do seguinte modo:

- | | |
|----------------------------|------------------------------|
| 1. Aeróbios | +500 a +300 mV |
| 2. Anaeróbios | +100 a \leq -250 mV |
| 3. Anaeróbios Facultativos | +300 a -100 mV ²⁵ |

Visto isto, as bactérias anaeróbias na sua maioria, como é o caso do género *Clostridium*, por exemplo, requerem valores de E^0 negativos, enquanto que as bactérias aeróbias requerem potenciais positivos. No caso dos microrganismos microaerófilos, as exigências situam-se em valores intermédios, verificando-se que o crescimento é beneficiado em situações de redução ligeira, são exemplo disso os lactobacilos e os estreptococos.³⁰

Para além dos factores acima mencionados, o desenvolvimento dos microrganismos depende ainda da disponibilidade de uma fonte de energia, uma fonte de azoto, vitaminas e minerais.

Em suma, em termos de exigências de crescimento, os bolores apresentam-se como os microrganismos com menor grau de exigência para o crescimento, seguindo-se as leveduras, as bactérias Gram negativas e por último as Gram positivas.

A estabilidade apresentada por alguns alimentos no que se refere ao ataque microbiano pode dever-se à existência na sua constituição de substâncias com actividade anti-microbiana. Alimentos como as especiarias, o leite e os ovos são bons exemplos. Assim sendo, face ao exposto, se soubermos de que modo cada parâmetro mencionado anteriormente está presente no alimento, pode prever-se o tipo de microrganismos com capacidade para se desenvolver nessa matriz.³³

3.6.2.2 Factores Extrínsecos

Estes estão essencialmente relacionados com o ambiente de armazenamento, e incluem a temperatura, a humidade relativa e a presença e concentração de gases (CO_2, O_2).³⁴

Os microrganismos são caracterizados consoante o seu crescimento em relação à temperatura. Assim de acordo com as temperaturas requeridas, os microrganismos podem ser divididos em classes, como se pode ver na tabela 9.

Tabela 9. Classificação dos microrganismos de acordo com os seus requisitos de temperatura.¹³

Temperatura (°C)	Psicrófilos	Psicrotróficos	Mesófilos	Termófilos
Mínima	< 0 a 5	< 0 a 5	10	40
Óptima	12-18	20-30	30-40	55-65
Máxima	20	35	45	> 80

Os microrganismos psicrotróficos têm uma temperatura óptima de crescimento entre 20 e 30 °C. Apesar disto alguns destes, podem crescer a temperaturas de refrigeração (≤ 5 °C). Nestes últimos estão incluídos a *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica* e o *Clostridium* não-proteolítico (tipos B, E e F). Já os microrganismos mesófilos têm temperaturas óptimas de crescimento entre 30 e 40 °C, alguns destes podem sobreviver e crescer ainda de forma satisfatória a temperaturas entre 20 e 40 °C, estão incluídos neste grupo espécies de *Salmonella*, *E. coli* (VTEC) e *S. aureus*. Por último os microrganismos termófilos, têm temperaturas óptimas de crescimento entre 55 e 65 °C, mas pode verificar-se por parte de algumas espécies sobrevivência e crescimento a valores de até 45 °C, mas nunca menos de 30 °C. É exemplo deste grupo o *C. perfringens*.²⁵ A valores de humidade relativa elevados mesmo que a temperatura seja baixa (frigoríficos) a actividade microbiana é iniciada rapidamente. Mesmo os alimentos secos, quando armazenados em locais húmidos, podem absorver água, aumentando deste modo a susceptibilidade ao ataque microbiano.

Tabela 10. Valores mínimos de a_w , necessários para o desenvolvimento de microrganismos. ¹⁷

Microrganismo	a_w (actividade da água mínima)
Bactérias (maioria)	0.91-0.88
Leveduras (maioria)	0.88
Fungos vulgares	0.80
Bactérias halófilas ⁱ	0.75
Fungos e leveduras osmofílicos ⁱⁱ	0.62-0.60

i Tolerantes a elevadas concentrações de sal ii Tolerantes a elevadas concentrações de açúcar

Tabela 11. Valores de a_w , de alguns alimentos. ¹⁷

Alimento	a_w (actividade da água à temperatura ambiente)
Frutos, vegetais frescos, carne, peixe	> 0.98
Carne cozinhada, pão	0.98 – 0.95
Carnes curadas, queijos	0.95 – 0.91
Salsichas, xaropes	0.91 – 0.87
Farinha, arroz, grãos	0.87 – 0.80
Frutos secos	0.65 – 0.60
Leite em pó, especiarias	0.60 – 0.20

A atmosfera onde são armazenados os alimentos é um factor muito importante, sendo cada vez maior o recurso a atmosferas modificadas ou controladas, isto é, casos em que a concentração de CO_2 é cerca de 10% ou em que se utiliza ozono, este último, como forte agente oxidante que é, não deve ser utilizado em embalagens cujos alimentos tenham na sua constituição uma grande quantidade de lípidos, uma vez que proporciona o aparecimento de off-flavors (ranço). Na tabela 12 encontram-se sumariados os factores intrínsecos e extrínsecos mais relevantes acima mencionados, com efeito na actividade e crescimento microbiano.

Tabela 12. Factores intrínsecos e extrínsecos que afectam o crescimento microbiano.^{1, 35}

Factores Intrínsecos	Factores Extrínsecos
pH, acidez, natureza do acidificante, % de capacidade tampão;	Temperatura;
Conteúdo em água e actividade da água (a_w);	Humidade relativa;
Potencial de oxidação-redução (E^0);	Intensidade da luz e comprimento de onda;
Presença de antimicrobianos;	Composição da atmosfera e razão dos constituintes;
Natureza e distribuição da flora microbiológica natural;	Características da embalagem e possíveis Interacções;
Presença de estruturas físicas;	Características do processamento;
Presença de estruturas biológicas;	Armazenamento, distribuição e considerações de manuseio.
Disponibilidade de nutrientes;	
Formas coloidais;	
Área superficial do substrato e razão área/volume.	

3.7 Microbiologia Preditiva

A aplicação de modelos matemáticos na microbiologia alimentar remonta a 1920, com o desenvolvimento de métodos para estudar o tempo de destruição térmica de microrganismos. A microbiologia preditiva teve início como uma ciência empírica, não quantitativa. Um dos primeiros registos da sua aplicação, foi por Esty e Meyer (1922), para descrição da destruição térmica de esporos de *C. botulinum* tipo A, através de um modelo logarítmico linear, modelo este que tem por base o facto de a determinada temperatura, a velocidade de morte térmica ser constante ao longo do tempo, ou seja a percentagem de células inactivadas por unidade de tempo é constante.^{36,37} Um avanço posterior, em 1936, por Scott, associou a velocidade de morte térmica com a disponibilidade de água na matriz, hoje denominada actividade de água. Este orientou posteriormente os seus estudos para a influência da variação da temperatura na velocidade de morte dos microrganismos.^{5, 23}

Nesta época, a indústria de enlatados, foi bastante influenciada por estes modelos matemáticos, sofrendo uma drástica evolução. Apesar da revolução que causou nos enlatados, a aplicação de modelos matemáticos, para descrever o crescimento e sobrevivência de microrganismos nos alimentos, não foi alvo de grande atenção até ao início dos anos 80. Considera-se, no entanto, que a origem da microbiologia preditiva moderna remonta aos anos 60 e 70 com o uso de modelos cinéticos para previsão da deterioração dos alimentos, seguindo-se o uso de modelos probabilísticos em relação a problemas de intoxicações alimentares, nomeadamente, o botulismo.³⁸

A nível comercial, apenas países como os Estados Unidos da América, Canadá e Inglaterra apresentavam alguma, embora reduzida, aplicação em indústrias alimentares. Foi a partir do ano de 1983, que se verificou um interesse maior na microbiologia preditiva, investindo-se na investigação e no financiamento nesta área. Surgiram, no final dos anos 80, os primeiros programas com base em modelos matemáticos para a descrição do comportamento microbiano em alimentos. No Reino Unido, foi lançado o *Food Micromodel*, pelo MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food), o qual descrevia o comportamento (crescimento, morte e sobrevivência) de microrganismos patogénicos em alimentos, relativamente a vários factores (temperatura, pH, a_w , atmosfera, concentração de ácidos orgânicos, NaCl e conservantes). Nos Estados Unidos, as pesquisas por parte do USDA (United States Department of Agriculture) resultaram no *Pathogen Modelling Program* (PMP). Por outro lado, na Europa, o crescente interesse no conceito de microbiologia preditiva, levou ao FLAIR (Food Linked Agricultural and Industrial Research), um programa de investigação em colaboração, que envolvia cerca de 30 laboratórios em 10 países da Comunidade Económica Europeia (CEE), para a avaliação da resposta de microrganismos quer patogénicos quer deteriorativos, numa vasta gama de produtos naturais.

O grande aumento do interesse na microbiologia preditiva, verificado na década de 80, foi atribuído principalmente a dois factores: um aumento na preocupação pública no adquirir de alimentos seguros e saudáveis, preocupação esta, ocasionada por um grande número de surtos de intoxicações alimentares ocorridos durante esta década, e por outro lado, a consciencialização de que os métodos existentes para determinação e quantificação de microrganismos, eram fortemente condicionados pelos tempos de obtenção de resultados, pelo que tinham pouco ou nenhum valor preditivo.³⁶ A disponibilidade

crescente de meios técnicos, como computadores, revelou-se também como um factor importante no desenvolvimento da microbiologia preditiva, já que a resolução rápida de equações matemáticas complexas se tornou muito mais fácil.²⁷

A microbiologia preditiva é uma área multidisciplinar que unifica conhecimentos de microbiologia, engenharia, química e estatística, com o intuito de obter informações fidedignas sobre o comportamento de microrganismos nos alimentos, isto é, descreve matematicamente o crescimento e/ou inactivação de microrganismos em alimentos, sob condições específicas. Visto isto, conhecer e perceber os factores que influenciam a microflora de um determinado alimento é imprescindível para determinar o seu tempo de vida útil, a sua qualidade e a sua segurança.

Inicialmente a microbiologia preditiva foi descrita por McMeeking (1993) no primeiro livro escrito sobre o tema, como uma ciência quantitativa capaz de avaliar objectivamente o efeito do processamento de alimentos. Actualmente a microbiologia preditiva é definida como uma ciência quantitativa que permite a avaliação objectiva dos efeitos do processamento, da distribuição e do armazenamento, na segurança microbiológica e na qualidade dos alimentos.³⁹

Os modelos matemáticos usados no âmbito da microbiologia preditiva são mais empíricos que os usados, por exemplo, nos processos fermentativos, isto porque nos alimentos o tipo e a concentração de nutrientes não são totalmente conhecidos e em geral não são factores limitantes e o facto de os microrganismos, em especial os patogénicos se encontrarem em números muito baixos inicialmente também incrementa as limitações deste tipo de modelos matemáticos.²⁷ Define-se modelo como a descrição de um sistema, teoria ou fenómeno, tendo em conta as suas características, de modo a poder-se inferir sobre outros estudos semelhantes a nível de características.¹⁹ Os modelos matemáticos visam, principalmente, prever quando e sob que condições o crescimento microbiano pode atingir números capazes de pôr em risco a saúde humana e animal.⁴⁰ Um bom modelo de crescimento microbiano, pode contribuir para a implementação e manutenção dos procedimentos a seguir por um sistema de HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points).^{2, 38} Na tabela 13 encontram-se sumariados os pontos-chave do sistema de HACCP e da microbiologia preditiva de forma comparativa.

Tabela 13. Pontos-chave do sistema de HACCP e da microbiologia preditiva.^{41, 38}

HACCP	Microbiologia Preditiva
I. Identificação de possíveis perigos e da sua severidade em diferentes etapas do processamento.	I. Identificar os microrganismos preocupantes.
II. Identificar os Pontos Críticos de Controlo (CCP), nos quais as medidas de controlo devem ser implementadas.	II. Perceber a ecologia do microrganismo de interesse, de modo a melhor identificar a fonte de contaminação.
III. Especificação dos critérios de controlo e métodos de proceder ao controlo (quando necessário).	III. Comparar as informações com as especificações de controlo existentes (i.e. Critérios de aceitação/ rejeição).
IV. Estabelecer e implementar procedimentos de monitorização e medidas de resposta para situações de não conformidade.	IV. Incorporar a informação obtida em sistemas de monitorização de crescimento microbiano.

Os modelos preditivos são classificados de acordo com o comportamento da população microbiana que descrevem. Existem modelos de crescimento, de inactivação e de limites de crescimento.

Os modelos podem ainda reflectir a cinética do comportamento dos microrganismos ou dar informação quanto à probabilidade de crescimento, morte ou produção de metabolitos/toxinas num dado período de tempo.

Outra classificação dada aos modelos matemáticos utilizados foi proposta por Whiting e Buchanan, os quais consideram os modelos como, primários, secundários ou terciários. Os modelos primários descrevem as alterações no número de microrganismos ou nas respostas microbianas com o tempo, num dado ambiente específico. Estes modelos estão aptos a estimar a quantidade de UFC/ g ou mL, a formação de toxinas, os níveis de substratos e/ou de produtos do metabolismo microbiano, ao longo do tempo, através do fornecimento de valores de parâmetros de equações específicas. Exemplos destes modelos primários são o modelo de inactivação térmica de primeira ordem e, os mais usados, o modelo de Baranyi e o modelo de Gopertz.^{38, 42}

Os modelos secundários indicam a forma como os parâmetros dos modelos primários se alteram com mudanças nos factores ambientais como a temperatura, pH actividade de água (a_w) entre outros. A temperatura é o factor de maior relevância nas reacções de deterioração de alimentos, principalmente na deterioração provocada por microrganismos, dado que a velocidade de crescimento dos microrganismos e a fase lag são largamente dependentes da temperatura.

Os modelos terciários consistem em softwares que conjugam os modelos primários e secundários, constituindo uma ferramenta útil para a aplicação a nível da produção industrial da microbiologia preditiva. Existem softwares comerciais, disponíveis de forma gratuita na internet, que podem ser usados para prever a resposta microbiana sob condições específicas, nomeadamente, o USDA's Pathogen Modeling Program (PMP) disponível em <http://pmp.arserrc.gov/PMPOnline.aspx>; o Seafood Spoilage Predictor, desenvolvido para prever o tempo de vida útil de alimentos de origem marinha armazenados a temperatura constante ou com variações de temperatura, disponível em <http://sssp.dtuqua.dk> e o ComBase, apoiado numa base de dados bastante abrangente para microbiologia preditiva, com acesso possível através de <http://www.combase.cc/support.html>. É, no entanto, importante que o uso destes programas seja feito tendo em conta a adequação ao produto em estudo, uma vez que as bases de dados em que estes programas se baseiam podem não contemplar as matrizes ou as condições que se pretendem estudar.

Na criação de um modelo preditivo, devem considerar-se cinco etapas fundamentais:

1. Planeamento;
2. Recolha de dados e análise dos mesmos;
3. Descrição matemática do modelo;
4. Validação do modelo;
5. Manutenção do modelo.

3.7.1 Programa ComBase

O *ComBase* é um programa disponível gratuitamente na Internet capaz de prever respostas em relação ao comportamento microbiano tendo em conta a matriz alimentar em que se encontra e as condições a que é submetido. O nome ComBase deriva do facto do programa funcionar apoiado numa base de dados combinada (**combined database**). Este programa foi criado por József Baranyi (Institute of Food Research, Norwich, UK). Este constitui um dos autores mais citados no âmbito da microbiologia preditiva. O seu modelo de crescimento bacteriano é frequentemente citado na literatura como “modelo de Baranyi”.

3.7.1.1 Modelo de Baranyi

O modelo de descrição do crescimento microbiano desenvolvido por Baranyi e Roberts tem vindo a ser utilizado amplamente desde que foi introduzido no início dos anos 90. A popularidade deste modelo deve-se de algum modo à disponibilidade de dois programas: DMFit e o MicroFit, distribuídos pelo Institute of Food Research, UK.

Este modelo descreve uma curva bacteriana sigmóide. A principal diferença entre este modelo e outras curvas sigmóides tais como as dadas pelo modelo de Gompertz, é a curvatura muito menos pronunciada quando comparada com a das curvas sigmóides clássicas.

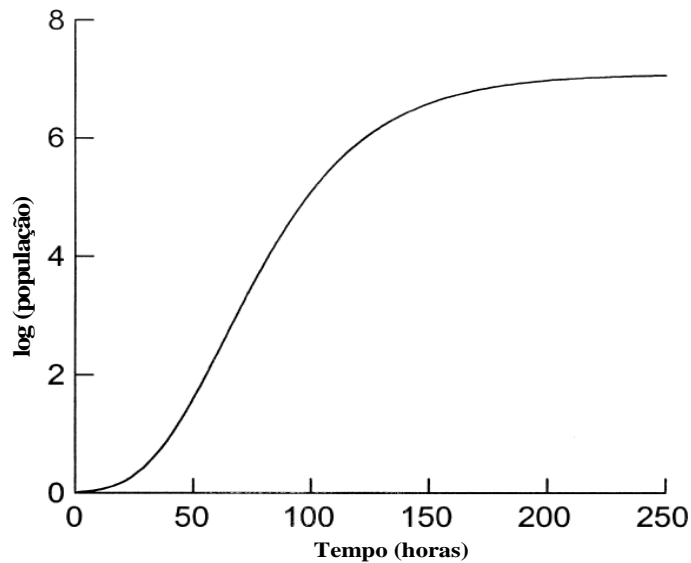


Figura 7. Exemplo de uma curva de crescimento microbiano gerada pelo modelo de Gompertz.⁴⁰

O modelo de Baranyi e Roberts tem 4 parâmetros principais: valor inicial, lag, velocidade máxima e valor máximo (final) e 2 parâmetros relativos à curvatura: mCurv e nCurv, que descrevem a curvatura do modelo sigmóide no início e no fim da fase de crescimento, respectivamente. Os valores relativos a estes parâmetros dependem do modelo escolhido no programa (DMFit), isto é, se se escolher "model of Baranyi and Roberts- no lag", o valor de mCurv é ajustado a 0, assim o modelo descreve apenas o crescimento/morte microbiana e a fase estacionária (figura 8).

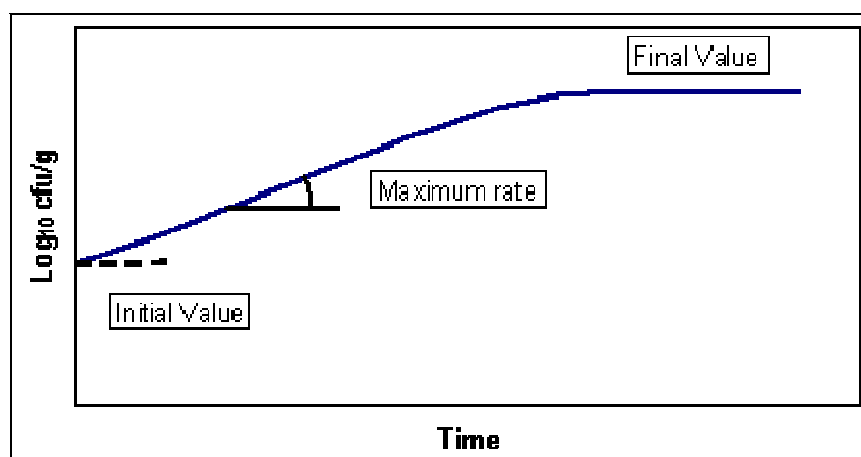


Figura 8. Exemplo de uma curva de crescimento microbiano gerada pelo modelo de Baranyi e Roberts- no lag.⁴³

Quando se considera a fase lag, o modelo considera que nesta se dá a síntese de um substrato q , o qual é crítico para o crescimento microbiano. Uma vez feito o ajuste por parte das células microbianas ao ambiente em que se encontram, estas crescem de forma exponencial. Nas figuras 9 e 10 estão representados exemplos em que a fase lag é considerada.

Se por um lado, for seleccionado “model of Baranyi and Roberts- no asymptot” o valor de $nCurv$ é 0, consequentemente, o modelo descreve somente a fase lag e a fase de crescimento/morte das células (figura 9).

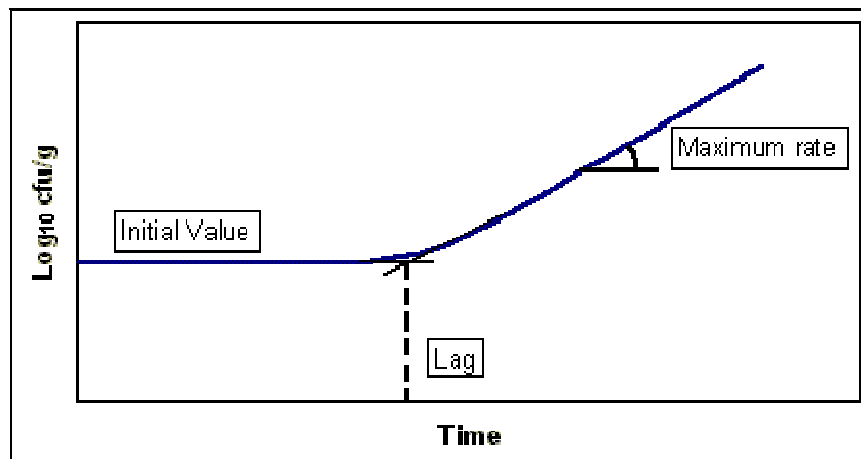


Figura 9. Exemplo de uma curva de crescimento microbiano gerada pelo modelo de Baranyi e Roberts- no asymptot.⁴³

Quando se selecciona “Baranyi and Roberts- complete model” os parâmetros definidos são $mCurv=10$ $nCurv=1$, tendo-se a representação das fases lag, de crescimento e estacionária da população microbiana (figura 10).

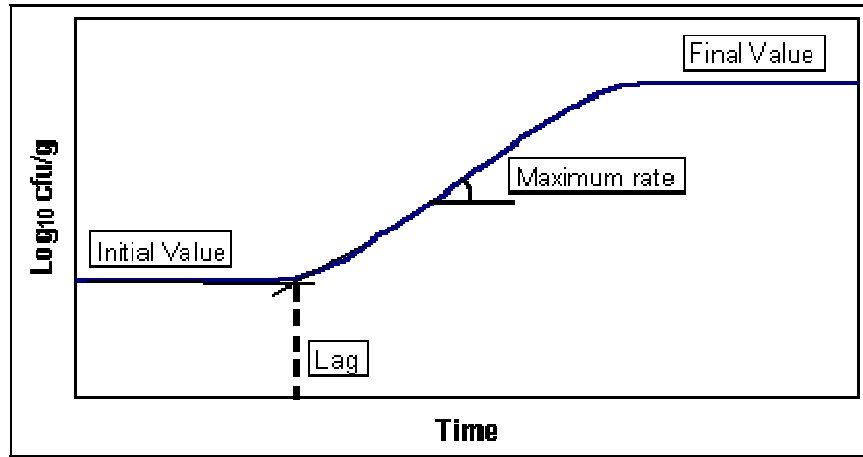


Figura 10. Exemplo de uma curva de crescimento microbiano gerada pelo modelo de Baranyi e Roberts - complete model.⁴³

Como equação base do modelo temos a equação:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{q(t)}{q(t) + 1} \cdot \mu_{\max} \cdot \left(1 - \left(\frac{x(t)}{x_{\max}} \right)^m \right) x(t)$$

Onde x representa o número de células existente no tempo t, x_{\max} é a densidade máxima de células e q(t) é a concentração do substrato limitante, a qual se altera com o tempo,

$$\frac{dq}{dt} = \mu_{\max} \cdot q(t)$$

O valor inicial de q ($q(0)$), é a medida inicial do estado fisiológico das células. Uma transformação mais estável de $q(0)$ pode ser definida através de

$$h_0 = \ln \left(1 + \frac{1}{q_0} \right) = \mu_{\max} \lambda$$

Como referido anteriormente, o parâmetro m define a curvatura antes da fase estacionária, quando este parâmetro é definido como 1, a função é simplificada. Assim o modelo final apresenta, como referido anteriormente, quatro parâmetros: x_0 , número inicial de células; h_0 (ver figura 11); x_{\max} ; e μ_{\max} , que correspondem ao número máximo de células e à

velocidade máxima de crescimento, respectivamente. Uma versão do modelo acima descrito, modelo de Baranyi, pode representar-se então por:

$$y(t) = y_0 + \mu_{\max} A(t) - \frac{1}{m} \ln \left(1 + \frac{e^{m\mu_{\max} A(t)} - 1}{e^{m(y_{\max} - y_0)}} \right)$$

$$A(t) = t + \frac{1}{v} \ln \left(\frac{e^{-vt} + q_0}{1 + q_0} \right)$$

Onde $y(t) = \ln x(t)$, $y_0 = \ln x_0$, e v é a velocidade do aumento do substrato limitante, geralmente igual à μ_{\max} .

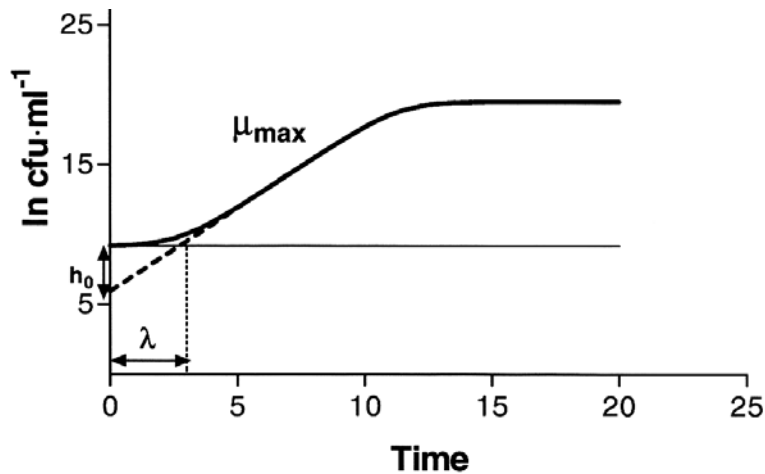


Figura 11. Exemplo de uma curva de crescimento microbiano gerada pelo modelo de Baranyi e Roberts.⁴⁴

Este modelo tem sido utilizado para prever o comportamento de uma grande variedade de microrganismos, os resultados obtidos estão incluídos no *software Food MicroModel*. Algumas das aplicações deste modelo são relativas ao comportamento de *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, crescimento de colónias de fungos termo-resistentes entre outros microrganismos.⁴⁴

3.7.1.2 Modelos tri-linear, bifásico e linear

Como o nome sugere, o modelo tri-linear descreve o crescimento bacteriano apoiado na representação de 3 rectas: a fase lag e a fase estacionária são representadas por 2 rectas horizontais, enquanto que o declive da restante recta descreve a fase de crescimento/morte, geralmente é denominado por velocidade máxima.⁴²

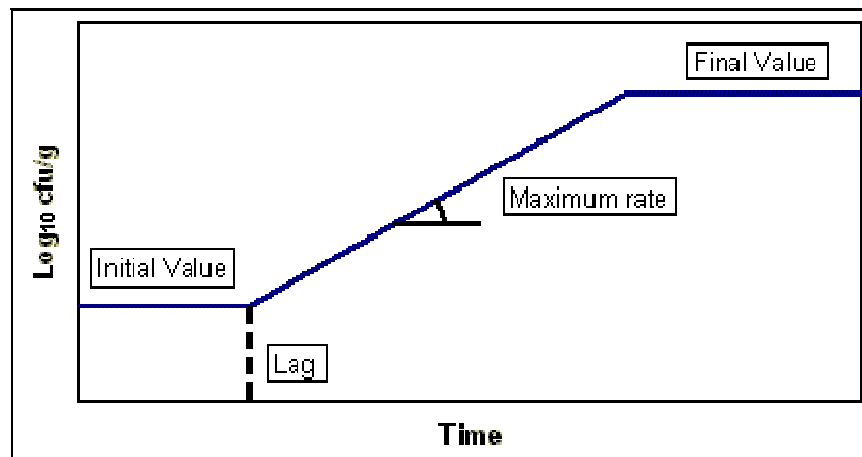
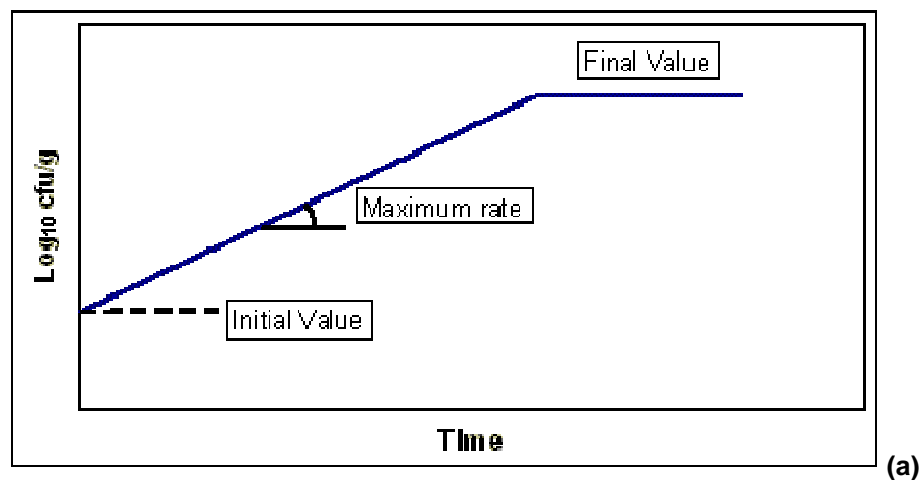


Figura 12. Exemplo de uma curva de crescimento microbiano gerada pelo modelo tri-linear.⁴³

Quando o crescimento bacteriano verificado não evidencia fase lag ou fase estacionária, os modelos bifásicos são preferíveis em relação ao tri-linear.



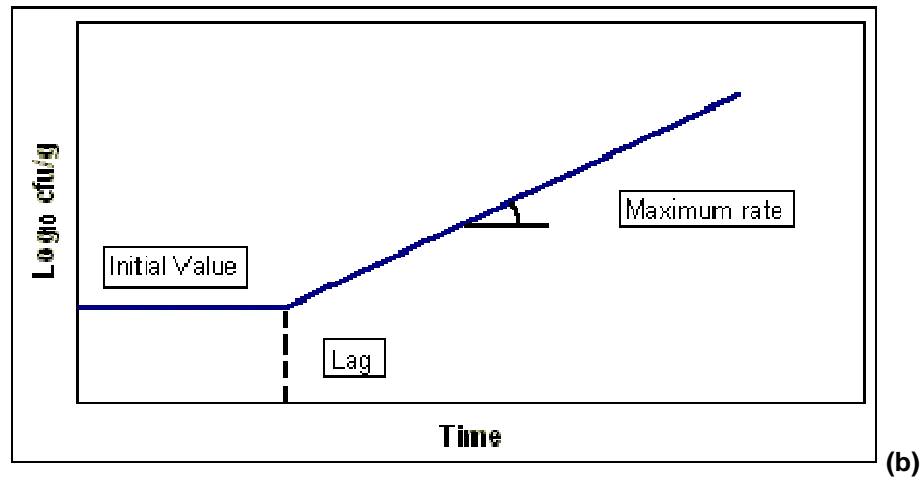


Figura 13. Exemplos de curvas de crescimento microbiano geradas pelo modelo bifásico (a) sem fase lag e (b) sem fase estacionária.⁴³

Por último, quando as contagens bacterianas descrevem apenas a fase de crescimento/morte microbiana, os dados devem ser tratados através do modelo linear.

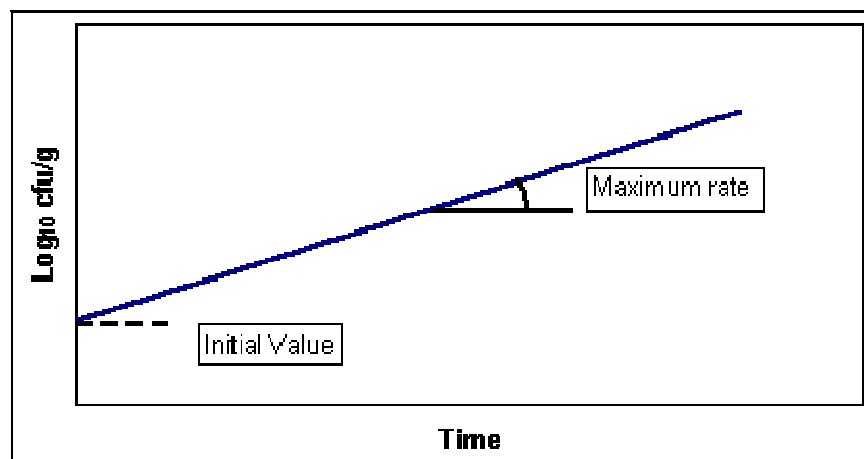


Figura 14. Exemplo de uma curva de crescimento microbiano gerada pelo modelo linear.⁴³

4

Parte Experimental

O presente trabalho foi desenvolvido no âmbito de um estágio na empresa Pascoal & Filhos S.A..

Numa primeira fase, o mesmo consistiu na aprendizagem e aplicação prática dos métodos e técnicas clássicas da microbiologia, através da observação e colaboração no laboratório interno de microbiologia da empresa. Nesta fase, foi feita também a adaptação dos conhecimentos adquiridos às diversas matrizes e procedimentos de análise correntes do laboratório interno. A familiarização com os processos de produção das refeições através do método “Cook-chill” foi feita também nesta fase inicial, através da observação e acompanhamento *in loco* dos processos, desde a preparação das matérias-primas, passando pela cocção, até ao armazenamento refrigerado dos produtos.

Numa segunda fase, a par das análises que servem de base a este trabalho, a realização prática e respectiva contagem de resultados das análises microbiológicas diárias feitas na empresa, aos produtos, superfícies e colaboradores, fizeram parte das tarefas

desenvolvidas no âmbito do estágio, assim como o controlo da qualidade de meios de cultura e o controlo e manutenção das temperaturas dos equipamentos.

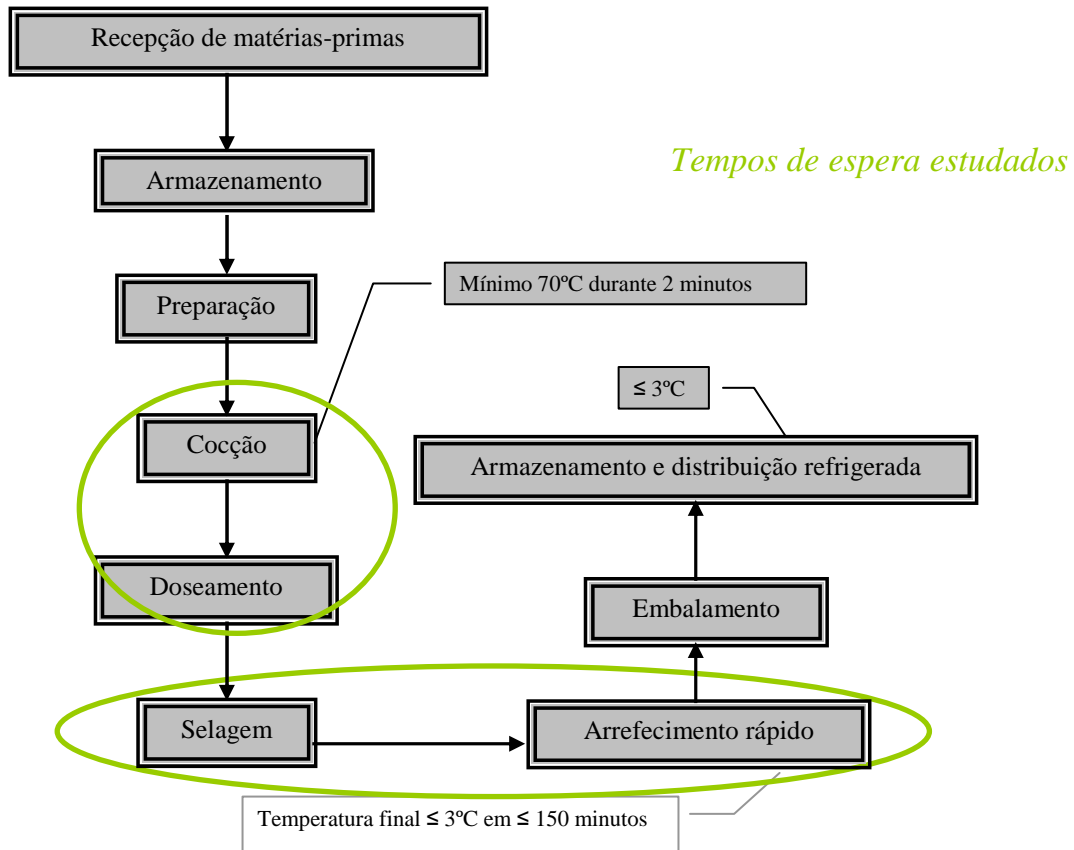
Fez também parte do trabalho desenvolvido, a colaboração em análises físico-químicas correntes, nomeadamente, na determinação do teor de humidade no pescado pela norma NP 2282, na determinação do teor de cloretos no pescado tendo como técnica a descrita na norma NP 2929, na análise de águas residuais e de consumo (pH, condutividade) e na determinação da turbidez em amostras de água.

Devido a reestruturações a que a empresa se submeteu ao nível do sistema de qualidade, foi necessária a revisão de instruções de trabalho, na qual colaborei, assim como na catalogação de equipamentos e material de laboratório, quer de microbiologia quer de físico-química.

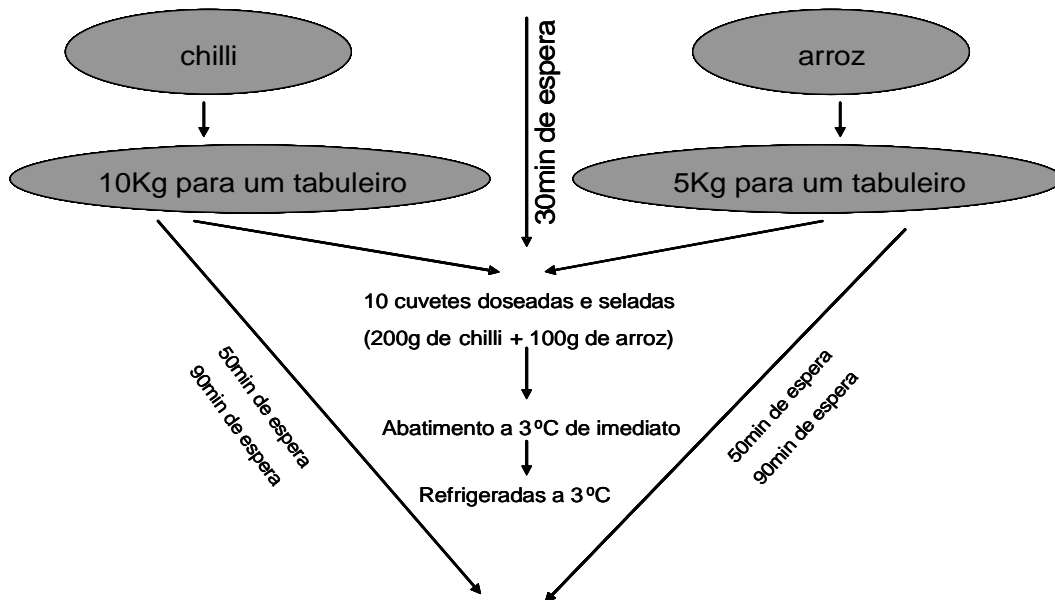
Também no âmbito do estágio foi possível o contacto com a realidade empresarial ao nível do contacto com fornecedores e equipas de manutenção de equipamentos laboratoriais.

4. Parte Experimental

Para se atingir o objectivo principal deste estudo, verificar qual o efeito dos tempos de espera a que se submete a refeição na carga microbiológica da mesma e na sua evolução posterior durante a conservação refrigerada a 3°C, foram planeadas amostragens com vista a submeter a refeição a tempos de espera diferentes, mantendo as outras variáveis. De seguida, para melhor visualizar o procedimento seguido, apresentam-se os esquemas representativos do que foi feito para cada um dos tempos de espera analisados. Na figura 15 (a), estão representadas as etapas em que os tempos foram alvo de estudo, na figura 15 (b), está um exemplo do procedimento seguido para o estudo no efeito do tempo de espera entre o fim da cocção e o doseamento das cuvets, e na figura 15 (c), está representado o procedimento seguido para avaliar o efeito do tempo de espera entre a selagem das cuvets e a redução rápida de temperatura.



(a)



Para cada tempo de espera foram doseadas 10 cufetes, submetidas de imediato a redução rápida de temperatura até 3°C e armazenadas sob refrigeração a 3°C até ao momento de análise microbiológica

(b)

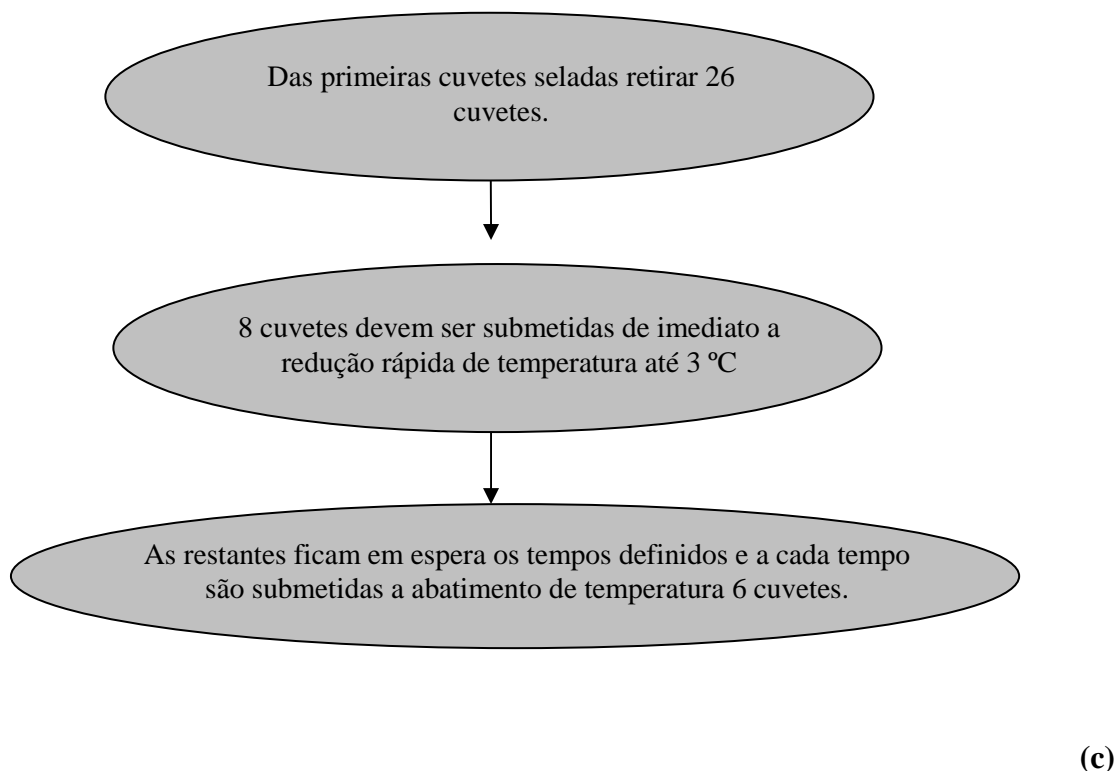


Figura 15. Esquema ilustrativo das etapas de produção estudadas (a), esquemas do planeamento do experimental a seguir para estudo dos tempos de espera a que as refeições foram submetidas, tempo de espera entre o fim da cocção e o doseamento (b) e entre a selagem das cuvetes e a redução rápida de temperatura (c).

4.1 Material

4.1.1 Reagentes e meios de cultura

Os meios de cultura utilizados (PCA, CCA, VRBDA, BPA, TSCA e RBCA) foram obtidos a partir de formulações desidratadas de meio, produzidas pela Merck, Alemanha. Os suplementos e o diluente (solução de Ringier) e outros reagentes usados, como o cloreto de sódio, telurito de potássio, também foram fornecidos pela Merck, Alemanha.

4.1.2 Amostras: “Chili de carne com Arroz Branco”

Constitui uma refeição de origem mexicana de sabores intensos, apresentando-se como uma refeição bastante saciante. Este prato tem por base o feijão vermelho com carne de vaca picada, tomate, pimentos vermelhos e arroz pré-cozinhado refrigerado.



Figura 16. “Chili de carne com Arroz Branco”

Em termos de ingredientes, o chili que constitui cerca de 65% da refeição completa, é constituído por 35% de carne de vaca picada, 26% de feijão vermelho, cebola e 6% de concentrado de tomate, 6% de pimento vermelho, água, alho, azeite, açúcar, sal, vinagre, caldo de carne [concentrado de extracto de carne (77%), sal, levedura, gordura animal, espessantes (E410 e E415), pimento, antioxidante (E310)], amido de milho, malaguetas (0.3%), louro, pimentão doce, cominhos, pimenta preta, paprika, tomilho, melão, glucose, soja em pó, aromas, extracto de piri-piri, extracto de pimento, espessante (E415), reguladores de acidez (E260, E270 e E330), conservantes (E211, E202), aipo, cravinho e gengibre. Os restantes 35% da refeição são de arroz, cuja preparação inclui água, arroz, azeite, cebola, alho, sal e louro.

A refeição é distribuída em embalagens que contêm 1 porção de 300g, 200 das quais são de chili e 100 de arroz. Em termos de informação nutricional, esta está representada na tabela 14.

Tabela 14. Informação nutricional da refeição “Chili de Carne com Arroz Branco”.

Valores médios	Por 100g	Por porção	%VDR ⁽ⁱ⁾
Valor Energético	510KJ	1531 KJ	
	121Kcal	363Kcal	18
Proteínas	7.9g	23.7g	
Hidratos de Carbono	14.5g	43.5g	
Açúcares	1.5g	4.5g	5
Lípidos	3.5g	10.5g	15
Saturados	1.0g	3.0g	15
Colesterol	8mg	25mg	
Fibras Alimentares	1.7g	5.1g	20
Sódio	0.288g	0.864g	
Equivalente em sal	0.7g	2.2g	36
Ácidos gordos trans	0.03g	0.09g	

(i) VDR tem por base uma dieta de 2000Kcal. As necessidades nutricionais variam em função do sexo, idade, nível de actividade física praticada, entre outros factores.

4.1.3 Processo de fabrico e obtenção das amostras

As amostras de Chili de Carne com Arroz Branco foram retiradas de preparações feitas em 4 dias distintos, na empresa Pascoal & Filhos S.A., tendo sido extraídas de lotes produzidos em condições normais de processamento (Lotes GF192240, GF192840, GF193340 e GF194020).

Os referidos lotes, foram produzidos de acordo com o fluxograma de produção representado na figura 17.

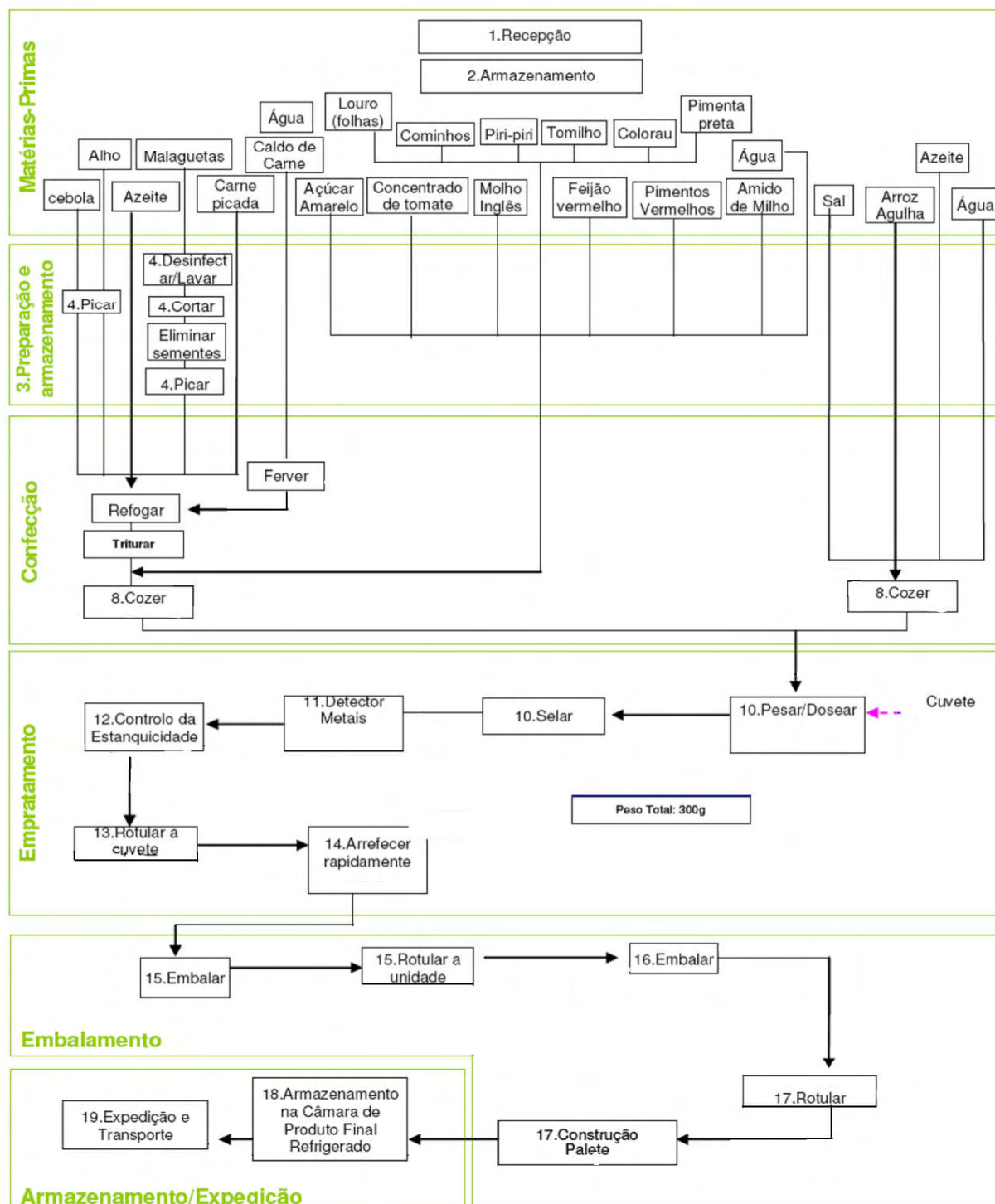


Figura 17. Fluxograma de produção da refeição Chili de Carne com Arroz Branco, pelo método Cook-chill.

No caso das amostragens 1, 2 e 3 (tabela 15) após a preparação da refeição, as amostras foram retiradas para um tabuleiro, onde foram mantidas até serem doseadas. A cada tempo definido, o doseamento foi efectuado para cuvets, de forma manual, as quais foram seladas com filme (anexo II) e submetidas de imediato a redução rápida de temperatura até 3 °C.

Cada conjunto de 10 cuvets sofreu tempos de espera diferentes entre a cocção e o doseamento. Após a redução de temperatura as amostras foram armazenadas sob refrigeração a temperatura controlada de 3 °C até ao momento de ser efectuada a análise.

No caso da amostragem 4 (tabela 16), após a cocção da refeição, esta seguiu o processamento normal de doseamento e selagem das cuvets, de forma automática (seladas com filme, anexo II). Neste caso as amostras para análise foram obtidas retirando as primeiras 26 cuvets seladas, as quais foram submetidas, em conjuntos de 6 a tempos de espera diferentes entre o término da selagem e a redução rápida de temperatura até 3 °C. Por fim foram armazenadas sob refrigeração a 3 °C até ao momento da análise microbiológica.

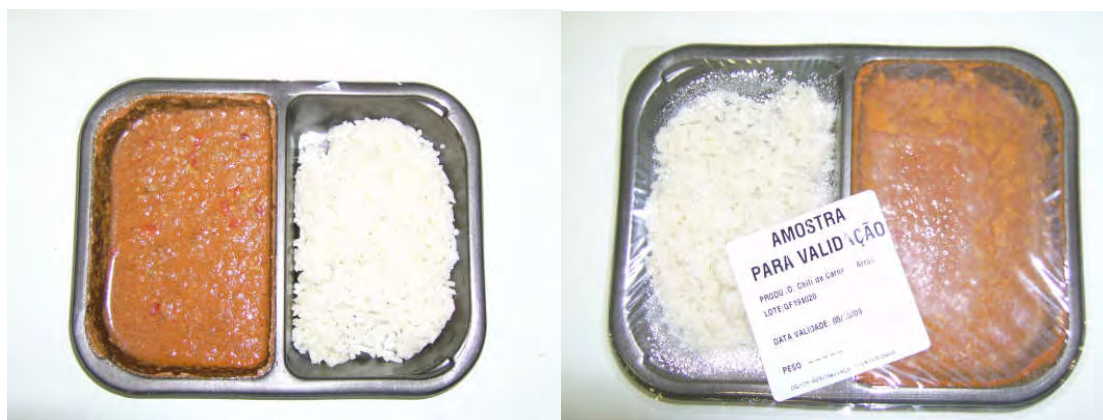


Figura 18. Amostras da refeição “Chili de Carne com Arroz Branco”.

Nas amostragens 1, 2 e 3, analisaram-se também amostras de algumas das matérias-primas utilizadas na produção de cada um dos lotes. As matérias-primas submetidas a análise foram: a carne de vaca picada, feijão vermelho enlatado, pimentos vermelhos congelados (em tiras), cebola picada, folhas de louro, cominhos moídos e folhas de tomilho.

4.2 Métodos

4.2.1 Avaliação das características microbiológicas das amostras

A avaliação microbiológica das amostras preparadas pelo método “Cook-chill” foi realizada durante um período de conservação de 18 a 21 dias, em dias especificados aquando do planeamento da retirada das amostras. Este planeamento foi feito tendo em conta as possibilidades de realização das análises e respectivas contagens de resultados no laboratório interno da empresa. Devido ao volume de trabalho de rotina no laboratório interno, a realização de duplicados nas análises foi impossível.

Os momentos de análise dos 4 ensaios realizados para a refeição encontram-se sumariados nas tabelas 15 e 16.

Tabela 15. Delineamento das análises realizadas na 1ª, 2ª e 3ª amostragens.

Amostra	Data de produção do Lote	Lote	Momento de análise (tempo após a produção dos lotes) (dias)
Chili de Carne com Arroz Branco produzido pelo método “Cook-chill”	28.05.09 (1ª amostragem)	GF192240	0
			1
			5
			8
			11
			18
	09.07.09 (2ª amostragem)	GF192840	1
			4
			6
			11
			14
			19
	13.08.09 (3ª amostragem)	GF193340	1
			4
			6
			11
			14
			19

Tabela 16. Delineamento das análises realizadas na 4ª amostragem.

Amostra	Data de produção do lote	Lote	Momento de análise (tempo após a produção dos lotes) (dias)
Chili de Carne com	29.09.09 (4ª amostragem)	GF194020	1
Arroz Branco			5
produzido pelo			10
método			15
“Cook-chill”			21

4.2.2 Análises microbiológicas

A análise microbiológica de alimentos é um método objectivo para a verificação da segurança alimentar, usado também para garantir a qualidade comercial dos alimentos.

Nem sempre a presença de microrganismos em alimentos apresenta um perigo para a saúde pública, pelo que a determinação do tipo de microrganismos presentes assim como a sua quantidade é de extrema importância.

Para a determinação de tempos de prateleira dos alimentos é importante conhecer a evolução da flora microbiana do produto. No caso deste estudo, para além das análises feitas à refeição em estudo, analisaram-se também algumas das matérias-primas usadas na sua constituição. Garantiu-se que as matérias-primas analisadas eram dos mesmos lotes das usadas na refeição. Assim, foi possível verificar qual a contaminação inicial de algumas das matérias-primas e inferir sobre a sua contribuição para a carga microbiológica do produto final.

Foram feitas análises à microflora total mesófila, *Enterobacteriaceae*, Coliformes e *E. coli*, e *S. aureus*. No caso das matérias-primas analisaram-se também bolores e leveduras.

Os géneros pertencentes à família *Enterobacteriaceae* para além de pertencerem à flora normal dos intestinos do ser humano e dos animais, também podem encontrar-se no solo e na água. Destacam-se desta família microrganismos importantes como a *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Klebsiella* e *Proteus*.

Para o efeito, no presente estudo foram utilizados os métodos clássicos de microbiologia a seguir descritos.

4.2.2.1 Preparação das amostras

A preparação da amostra consiste no processo aplicado à amostra afim de a tornar apta para a identificação e quantificação da carga microbiológica nela existente, por unidade de massa ou de volume. Para os efeitos do presente estudo a preparação foi efectuada segundo as normas NP 1828 (1982), NP 1829 e NP 2079.

As amostras para análise obtiveram-se através da retirada, com os devidos cuidados de assepsia, de porções representativas da amostra, com cerca de 10-15g, para sacos esterilizados, as quais foram pesadas (KERN 770, Reagent 5, nº 60308147). Adicionou-se Solução de Ringier (Merck, Alemanha) na proporção de 1:9 afim de se obter a diluição 10^{-1} . As amostras foram submetidas a homogeneização durante 1 minuto num homogeneizador Stomacher (Masticator Silver, Selecta, VWR)).^{45, 46, 47}

4.2.2.2 Preparação das diluições

A diluição das amostras é o processo responsável pela redução do número de microrganismos por unidade de volume. Este procedimento tem como principal objectivo tornar possível a contagem dos microrganismos existentes numa quantidade conhecida de produto. A primeira diluição (diluição-mãe) é a suspensão obtida de uma porção, previamente pesada de produto, numa quantidade de diluente, numa proporção de 1:9, respectivamente. As diluições decimais são obtidas pela mistura de um determinado volume da diluição-mãe e das diluições subsequentes e solução de diluente numa proporção de 1:9, respectivamente. Repetindo-se este procedimento até se obter a diluição desejada, ou seja, aquela em que a contagem em placa de microrganismos se encontra entre 30-300 UFC, ou no caso da utilização de meios selectivos, entre 15-150 UFC.

A solução de diluente utilizada foi a solução de Ringier fornecida pela Merck, Alemanha.

Tendo em conta o histórico da empresa, foram feitas diluições até 10^{-3} na refeição, uma vez que não se esperava obter contagens para além desta diluição e diluições até 10^{-5} nas matérias-primas, dada a presumível maior contaminação.

A preparação das diluições para o presente estudo, foi efectuada de acordo com a NP 3005 (1985).⁴⁸

4.2.2.3 Contagem de microrganismos totais mesófilos (30 °C)

Efectuaram-se sementeiras por incorporação de alíquotas de 1 mL das diluições, em meio de cultura PCA (Plate Count Agar, Merck), tendo-se efectuado as contagens das colónias formadas após a incubação a 30 (\pm 1) °C durante 48 horas (Microbiological Incubator, series BD53, Binder, VWR) em aerobiose, tal como é indicado na norma NP 4405 (2002).

Os resultados foram expressos em Log do número de unidades formadoras de colónia por grama de alimento (Log UFC/g).⁴⁹

4.2.2.4 Contagem de Enterobactereaceae

Realizou-se através da sementeira por incorporação de 1 mL da diluição 10^{-1} , e em alguns casos da diluição 10^{-2} , em meio de cultura VRBDA (Violet Red Bile Dextrose Agar, Merck), tendo-se efectuado a contagem das colónias características após incubação a 35 (\pm 1) °C, durante 24 horas (Microbiological Incubator, series BD53, Binder, VWR), em aerobiose, conforme o descrito na norma NP 4137/1991.

Os resultados foram expressos em Log do número de unidades formadoras de colónia por grama de alimento (Log UFC/g).⁵⁰

4.2.2.5 Contagem de Coliformes e *E. coli*

A contagem foi feita recorrendo à sementeira por incorporação de 1 mL da diluição 10^{-1} e em alguns casos da diluição 10^{-2} em meio de cultura CCA (Chromocult Colifom Agar, Merck). A utilização deste meio cromogénico, permite a identificação simultânea de coliformes (formam colónias salmão/vermelho) e de *E. coli* (formam colónias azul escuro/violeta). As placas foram incubadas a $35 (\pm 1) ^\circ\text{C}$, durante 24 horas (Microbiological Incubator, series BD53, Binder, VWR), em aerobiose, conforme o descrito na norma NP 2164, NP 2308 e NP 4396 (2002).^{51, 52, 53} A confirmação das colónias de *E. coli*, caso se verificasse a sua presença, seria feita com base na identificação da presença da enzima β -glucoronidase e da triptofanase.

Os resultados foram expressos em Log do número de unidades formadoras de colónia por grama de alimento (Log UFC/g).

4.2.2.6 Pesquisa de *S. aureus* coagulase positivos

A pesquisa de *S. aureus* foi feita através da sementeira por incorporação de 1 mL da diluição 10^{-1} em meio de cultura e isolamento BPA (BAIRD-PARKER Agar) ao qual se adicionou o suplemento Egg-yolk tellurite emulsion, ambos fornecidos pela Merck. A contagem de colónias foi feita após a incubação das placas em aerobiose, a $35 (\pm 1) ^\circ\text{C}$, durante 48 horas (Microbiological Incubator, series BD53, Binder, VWR).⁵⁴ A confirmação das colónias características (colónias negras, convexas, brilhantes com diâmetro compreendido entre 0.5-2 mm, rodeadas por um precipitado branco e por um halo transparente) deveria ser feita através da pesquisa da catalase e da coagulase. A presença de apenas uma colónia coagulase positiva, seria suficiente para se concluir a presença de *S. aureus* na amostra.

Assim, sendo d_1 o expoente da mais alta diluição positiva para a presença de *S. aureus* e d_2 o expoente da mais baixa diluição negativa para a presença de *S. aureus*, a pesquisa de *S. aureus* é:

Positiva em 10^{d_1} g ou mL de alimento e negativa em 10^{d_2} g ou mL de alimento.

4.2.2.7 Contagem de bolores e leveduras

Foi feita a contagem de bolores e leveduras às matérias-primas analisadas. Nomeadamente, feijão vermelho enlatado, carne de vaca picada, pimento em tiras congelado, cebola picada, folhas de louro, folhas de tomilho e cominhos moídos. A determinação foi feita através de sementeira por espalhamento à superfície, de 1 mL de amostra, da diluição 10^{-1} , dividido em 5 placas com meio RBCA (Rose-Bengal Chloramphenicol Agar) previamente solidificado, à razão de 0.2 mL por placa. As contagens foram feitas após incubação a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$ durante 5 dias, conforme o indicado pela norma NP 3277 – 1.⁵⁵ Os resultados foram expressos segundo os seguintes cálculos:

Sendo:

n = soma do número de colónias de bolores contadas nas 5 placas da diluição considerada;

n' = soma do número de colónias de leveduras contadas nas 5 placas da diluição considerada;

d = denominador da diluição em relação à qual se efectuem as contagens.

O teor de fungos (bolores e leveduras) na amostra por grama ou mL é dado por:

$$(n + n') \times d$$

No caso de não se verificar qualquer valor por ausência de colónias, o resultado exprime-se por $< 1 \times d$ colónias por g ou mL. Caso se verifique um excesso de colónias o resultado exprime-se por $> 7.5 \times 10^2 \times d$ colónias por g ou mL.

4.2.3 Análises físico-químicas das amostras

Foi realizada a medição do potencial de hidrogénio iónico (pH) da refeição em estudo e das suas partes em separado, isto é, o chili e o arroz. Foi também medida a actividade de água, denominada a_w , esta última diz respeito à quantidade de água presente no alimento na forma livre, estando por isso apta a ser utilizada em reacções químicas ou por microrganismos.

4.2.3.1 Determinação do pH

Entende-se pH ou potencial de hidrogénio iónico, como sendo o Log do inverso da concentração de iões H^+ , existente na amostra, concentração expressa em grama por litro.

Tendo a NP 3441 (1990) como referência, após a homogeneização da amostra como um todo e de cada uma das partes, introduziu-se as mesmas em copos de modo a possibilitar a introdução do eléctrodo (Multímetro HI 98130, Hanna Instruments, nº537071).

Foram efectuadas 3 medições para cada uma das amostras, registando-se o valor após esperar que a leitura ficasse constante.⁵⁶

4.2.3.2 Determinação da actividade da água (a_w)

A mediação da actividade da água é muito importante para avaliar a susceptibilidade de um produto ao crescimento microbiano. Quanto maior a a_w , maior a quantidade de água disponível para o metabolismo do microrganismo, logo, maior é a possibilidade dos microrganismos crescerem e se multiplicarem.

As análises foram feitas na Universidade de Aveiro. Para as medições foi utilizado um Higrómetro Rotronic – Hygroscop DV-2 (S. No. 1398000/2). Os porta-amostras foram adaptados, de modo a rentabilizar as análises através da diminuição do tempo necessário para a estabilização da leitura.

Foram feitas 3 réplicas de cada amostra, chili, arroz e a refeição completa. A temperatura a que se efectuaram as medições foi controlada, para que as condições fossem semelhantes. Esta manteve-se entre 24.0 e 24.5 °C.

5

Resultados e Discussão

5. Resultados e Discussão

5.1. *Matérias-Primas*

Com o intuito de verificar a contaminação inicial das matérias-primas usadas na produção da refeição, analisaram-se as mais problemáticas de acordo com dados bibliográficos e com o histórico da empresa, sendo estas, a carne de vaca picada, o feijão vermelho enlatado, pimento em tiras congelado, cebola picada, folhas de louro, folhas de tomilho e cominhos moídos.

Garantiu-se que as amostras retiradas foram dos mesmos lotes dos usados na produção dos lotes de refeição em estudo, afim de se poder inferir quanto à contribuição para o produto final. Como o referenciado no procedimento experimental foram feitas análises à flora microbiana total mesófila, enterobactérias, coliformes totais e *E. coli*, *S. aureus* e bolores e leveduras. Na figura 19 está representada a carga microbiológica mesófila registada. A carga verificada foi, possivelmente, inflacionada pelo

facto da análise às matérias-primas ter sido feita apenas no dia posterior à sua retirada, ficando estas armazenadas sob refrigeração.

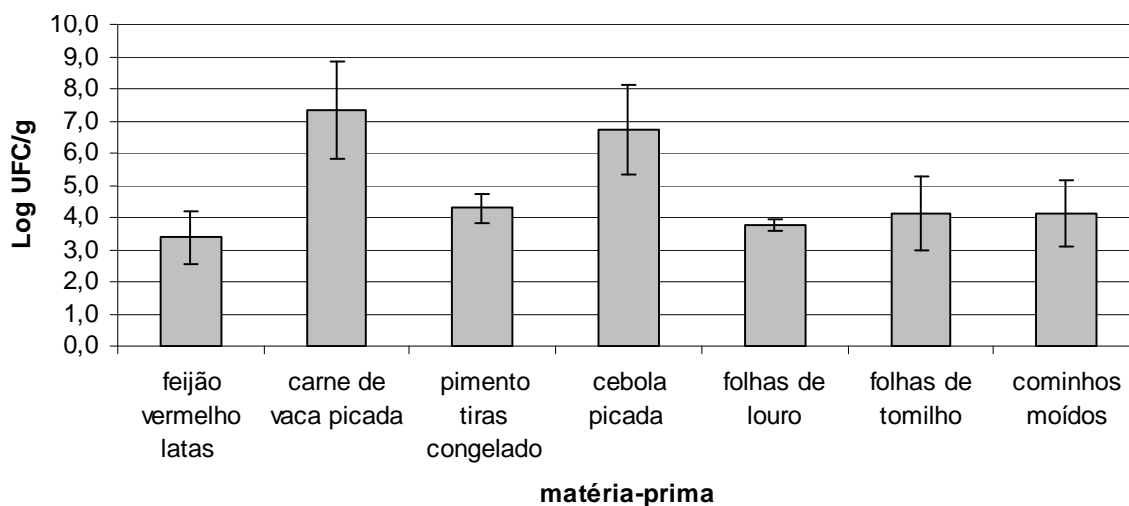


Figura 19. Média da carga microbológica total mesófila das matérias-primas analisadas na 1ª, 2ª e 3ª amostragem.

No que se refere às contagens de coliformes totais e enterobactérias só estão representadas as matérias-primas onde houve crescimento em placa, nas restantes não se verificou crescimento. No caso da cebola picada, a contagem de enterobactérias não foi possível devido ao excessivo crescimento verificado, apesar das numerosas diluições efectuadas.

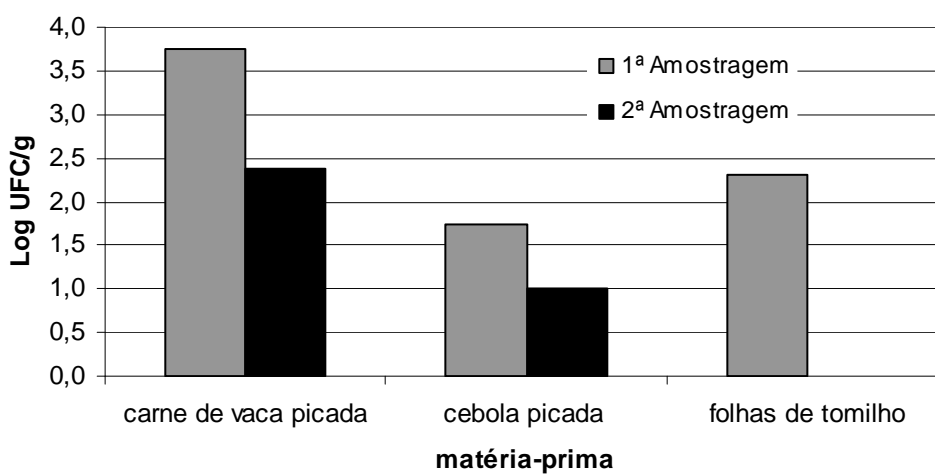


Figura 20. Contagens de coliformes totais nas matérias-primas analisadas.

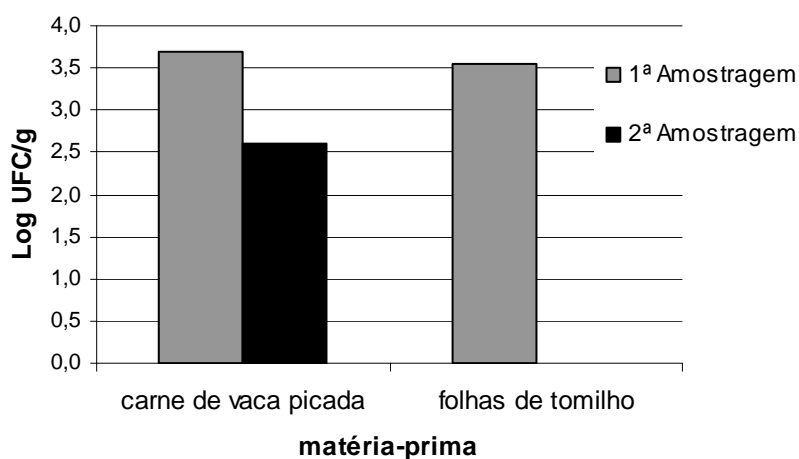


Figura 21. Contagens de Enterobactérias nas matérias-primas analisadas.

Em todas as amostras analisadas não se verificou a presença de *S. aureus*.

Quanto à contagem de bolores e leveduras, os resultados estão apresentados na tabela 17 e dizem respeito às matérias-primas da 3ª amostragem.

Tabela 17. Teor de fungos das matérias-primas usadas na confecção da refeição em estudo na 3ª amostragem.

Matéria-prima	Teor de fungos/g
Carne de vaca picada	2.53×10^5
Pimento vermelho tiras congelado	1.10×10^4
Cebola picada	1.18×10^5
Folhas de louro	4.70×10^4
Folhas de tomilho	$< 1 \times 10^1$
Cominhos	1.70×10^4

Comparando os resultados com os valores relativos aos critérios estabelecidos, pode ver-se que as matérias-primas usadas respeitam os critérios microbiológicos em vigor, à excepção da carne picada e da cebola picada. É importante referir que este incumprimento nestas duas matérias-primas poderá ser devido, como referido anteriormente, ao facto das análises não terem sido feitas no dia da recolha. Ainda assim, é importante ter presente que

as análises não seguiram, por impossibilidade de recursos, os parâmetros de amostragem requeridos para o aplicar destes critérios.

5.2 Efeito do tempo de espera entre a cocção e o doseamento da refeição

Primeira Amostragem

5.2.1 Variação de temperatura após a cocção da refeição

Num primeiro estudo, as amostras retiradas eram constituídas apenas por $\frac{1}{4}$ do conteúdo real da refeição numa situação de produção normal, isto é, 50 g de chili e 25g de arroz, afim de se evitar desperdícios de produto.

Na figura 22 e 23, pode ver-se a variação de temperatura sofrida por cada uma das partes da refeição, chili e arroz, antes de serem doseadas para as cuvetes e antes de serem submetidas a redução rápida de temperatura, respectivamente. No primeiro caso a temperatura foi medida dentro do tabuleiro, enquanto no segundo a medição foi feita dentro das cuvetes já seladas.

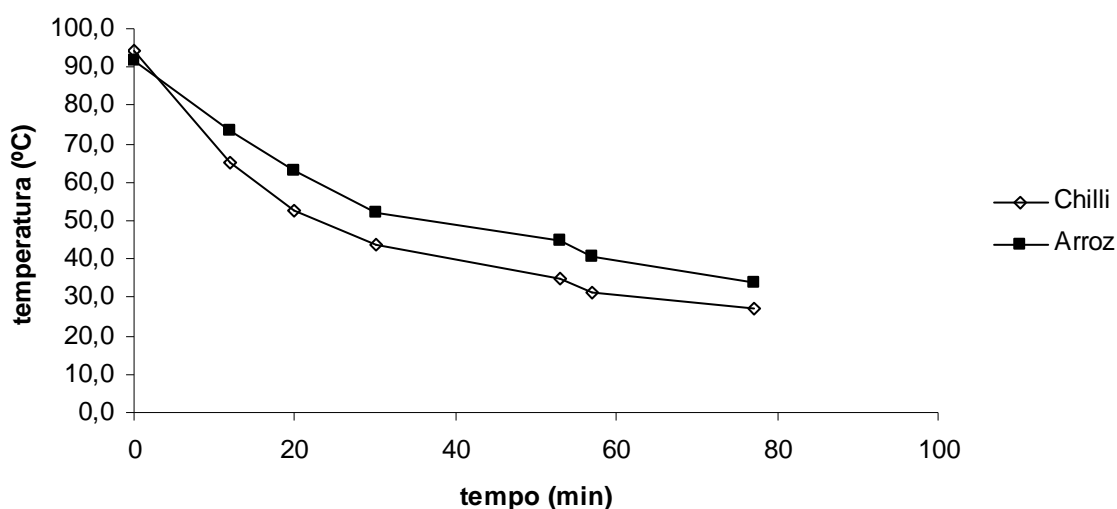


Figura 22. Variação de temperatura durante a espera das partes integrantes da refeição, antes de se efectuar o doseamento para as cuvetes. Temperatura medida dentro do tabuleiro.

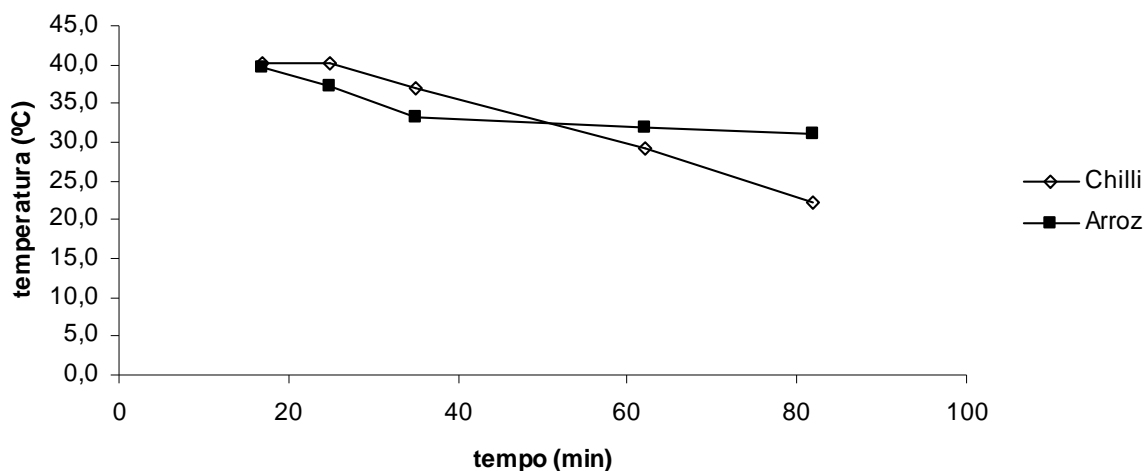


Figura 23. Variação de temperatura das partes integrantes da refeição, antes de se efectuar a redução rápida de temperatura. Temperatura medida dentro da cuvete em amostras com tempos de espera antes do doseamento diferentes.

Como se pode verificar pela figura 22, ambas as partes da refeição foram retiradas para os tabuleiros depois de atingirem valores de temperatura seguros (acima de 90 °C). Estes valores de temperatura atingidos, garantem alguma margem de segurança à refeição na medida em que lhes conferem algum tempo até entrarem na gama de temperatura de risco (5 a 63 °C). Neste caso, como as quantidades de amostra eram muito reduzidas a diminuição de temperatura foi muito rápida, esta foi uma das razões que levou a planear os estudos seguintes utilizando as quantidades de produto de uma situação real de produção.

5.2.2 Análises microbiológicas

No que diz respeito às análises microbiológicas, por impossibilidade de recursos, não foi possível fazer as análises em duplicado, uma vez que, houve necessidade de conciliar os estudos, com as análises correntes do laboratório interno da empresa. Teve-se em conta para o planeamento das análises o historial de resultados da empresa.

Os resultados foram obtidos através da contagem directa em placa e foram expressos em Log UFC/g.

5.2.2.1 Contagem de microrganismos totais a 30°C

Na figura 24 está representada a evolução da carga microbiológica da refeição completa ao longo de 18 dias de armazenamento refrigerado a 3 °C, em condições de temperatura controladas, em amostras com tempos de espera distintos.

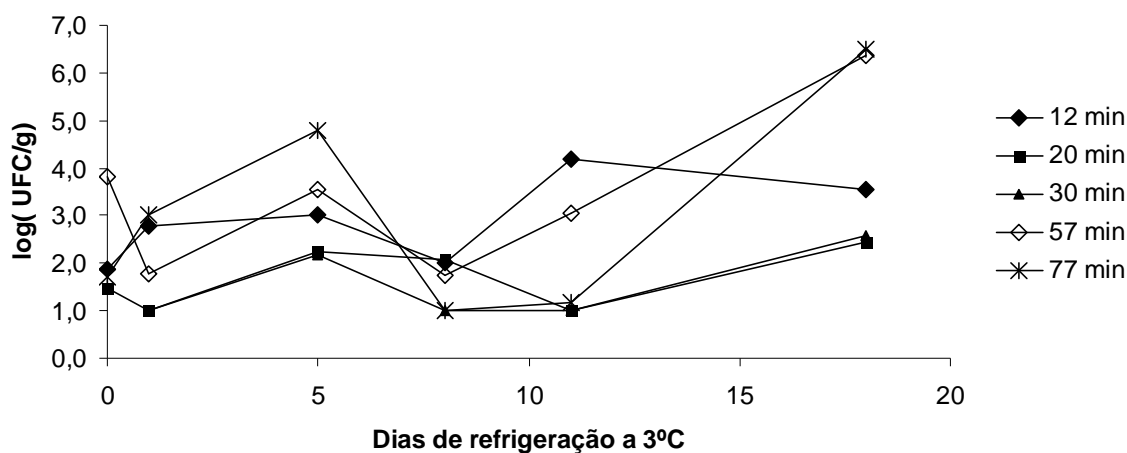


Figura 24. Variação carga microbiológica da refeição completa (chili de carne com arroz) ao longo do armazenamento, considerando amostras com tempos de espera diferentes entre a cocção e o doseamento na 1ª amostragem.

A figura 25 mostra a evolução em termos microbiológicos apenas do chili de carne ao longo do tempo de armazenamento refrigerado.

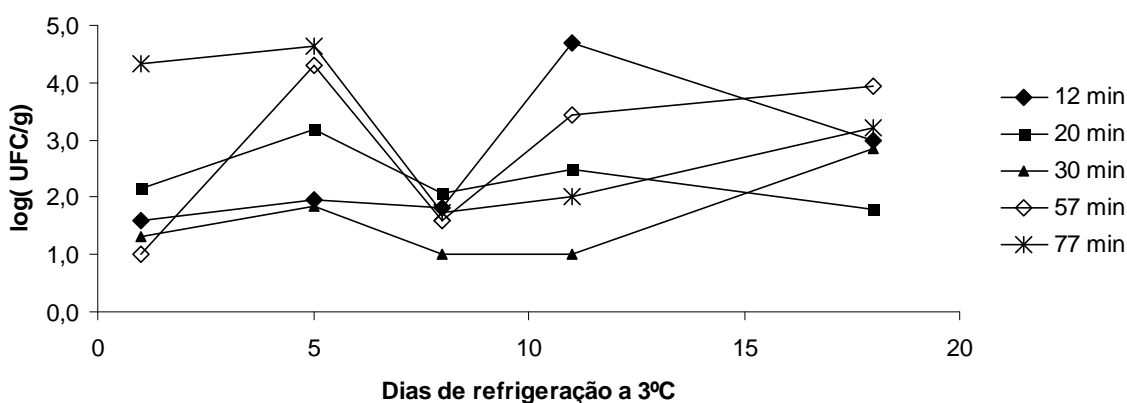


Figura 25. Variação carga microbiológica do chili de carne ao longo do armazenamento, considerando amostras com tempos de espera diferentes antes do doseamento, na 1ª amostragem.

Afim de se verificar qual o efeito do tempo de espera no evoluir da carga microbiológica da refeição em estudo, os resultados foram representados em função dos tempos de espera a que as preparações foram sujeitas, conforme mostram as figuras 26 e 27.

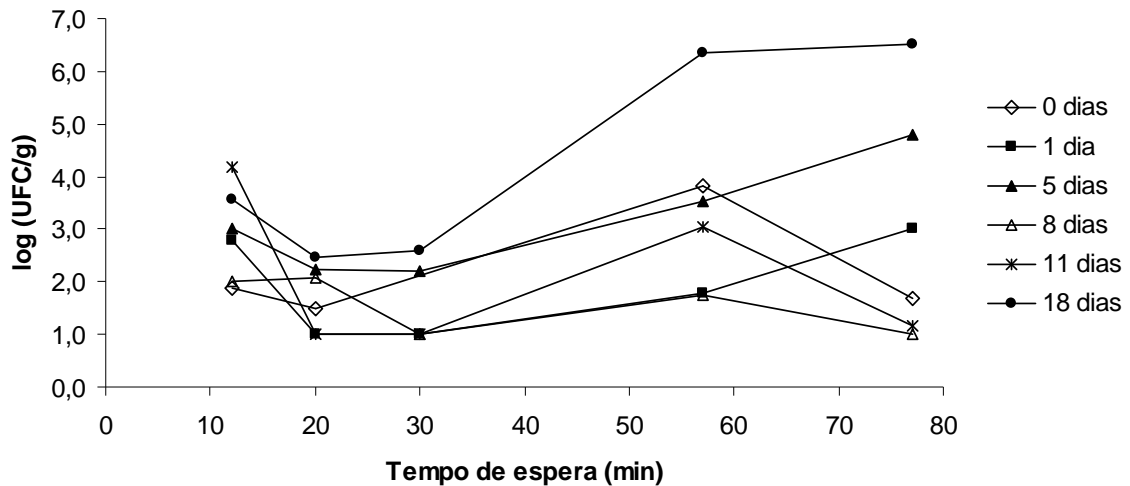


Figura 26. Variação carga microbiológica da refeição completa (chili de carne com arroz) tendo em conta os tempos de espera sofridos, na 1ª amostragem.

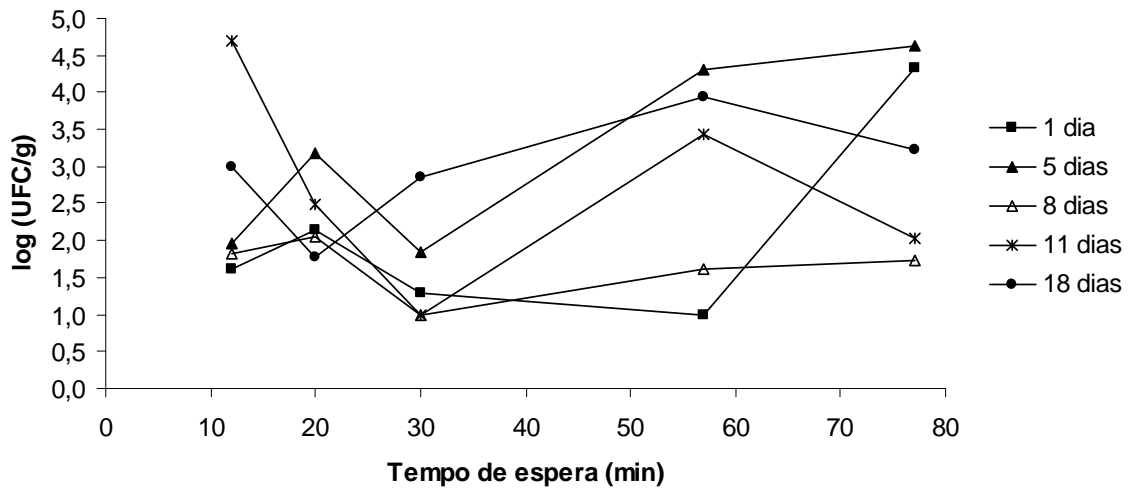


Figura 27. Variação carga microbiológica do chili de carne, tendo em conta os tempos de espera sofridos, na 1ª amostragem.

5.2.2.2 Contagem de Enterobactereaceae, Coliformes, Escherichia coli e Staplylococcus aureus

Não se verificou qualquer crescimento de enterobactérias, coliformes e *E. coli* nas amostras estudadas da refeição de “Chili de Carne com Arroz Branco”. A presença de *S. aureus* também foi negativa. Tal facto vai de encontro ao historial de resultados da empresa.

5.3 Efeito do tempo de espera entre a cocção e o doseamento da refeição
Segunda Amostragem

5.3.1 Variação de temperatura após a cocção da refeição

Na amostragem 2 as quantidades usadas para as amostras foram iguais às usadas numa situação real de doseamento da empresa: 200g de chili de carne e 100g de arroz.

As quantidades reduzidas usadas na primeira amostragem, mostraram que nessas condições não seria possível extrapolar os resultados para uma situação real de processamento, uma vez que, os resultados de carga microbiológica mesófila que se verificaram foram muito superiores aos normais do historial da empresa para esta refeição. Esses valores foram, possivelmente, devidos à maior razão de volume de ar/volume de produto dentro da cuvete, na 1ª amostragem, associado também à maior diminuição de temperatura, devido à menor quantidade de produto.

Na figura 28 está representada a variação de temperatura que os constituintes da refeição sofreram, numa situação em que são usados valores de massa reais de produção, 200g de chili e 100g de arroz.

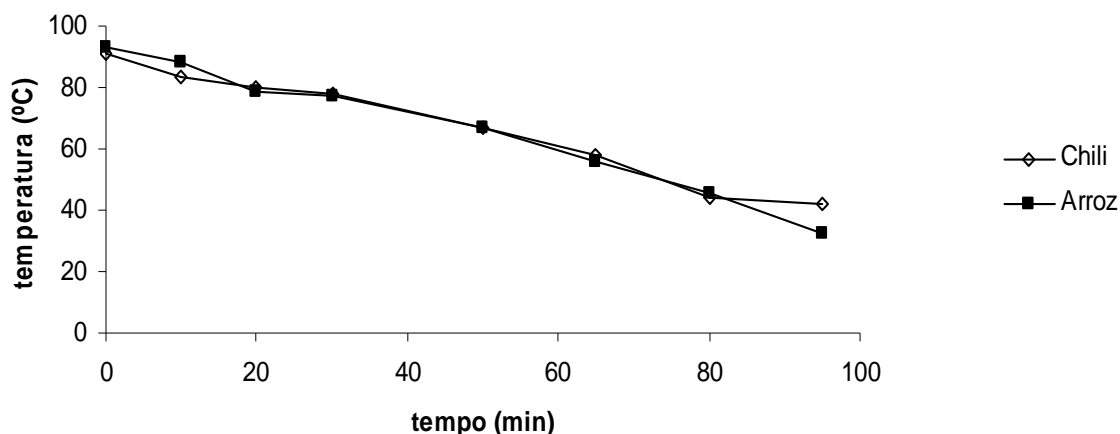


Figura 28. Variação de temperatura durante a espera, das partes integrantes da refeição, entre o término da cocção e o doseamento das cuvets, na 2ª amostragem. Temperatura medida dentro do tabuleiro.

5.3.2 Análises microbiológicas

Tal como foi referido para a 1ª amostragem, não foi possível fazer as análises em duplicado, por impossibilidade de recursos, tendo sido levado em conta historial de resultados da empresa, para definição das diluições a efectuar.

Os resultados foram obtidos através da contagem directa em placa e foram expressos em Log UFC/g.

5.3.2.1 Contagem de microrganismos totais a 30°C

Nas figuras 29 e 30 está representada a evolução da carga microbiológica do chili de carne e do arroz, respectivamente, ao longo de 18 dias de armazenamento refrigerado em condições de temperatura controladas, em amostras com tempos de espera distintos. Como se pode ver, nesta amostragem os resultados indicam que os tempos de espera a que o chili é submetido não influenciam muito a evolução da sua carga microbiológica, ao longo do tempo de armazenamento refrigerado. Apesar disto pode ver-se que para tempos de espera superiores a 60 minutos já é verificada uma tendência para o aumento da carga

microbiológica. No caso do arroz, os resultados indicam que existe influência por parte do tempo de espera no evoluir da carga microbiana.

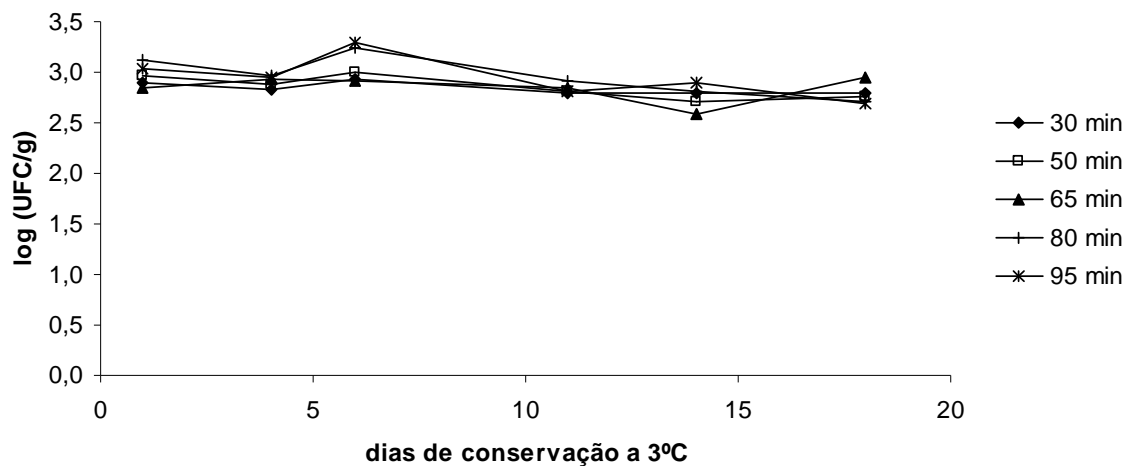


Figura 29. Variação carga microbiológica do chili de carne ao longo do armazenamento, considerando amostras com tempos de espera diferentes entre o fim da cocção e o doseamento das cuvets, na 2ª amostragem.

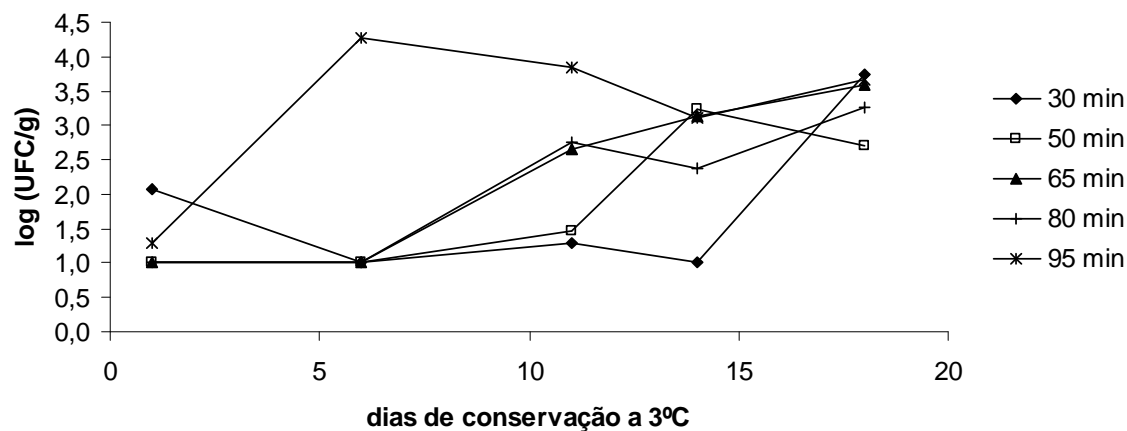


Figura 30. Variação carga microbiológica do arroz ao longo do armazenamento, considerando amostras com tempos de espera diferentes entre o fim da cocção e o doseamento das cuvets, na 2ª amostragem.

Do mesmo modo, que se fez para a amostragem 1, representou-se a evolução da carga microbiológica das amostras, em função dos tempos de espera sofridos, a apresentação é feita nas figuras 31 e 32 que se seguem.

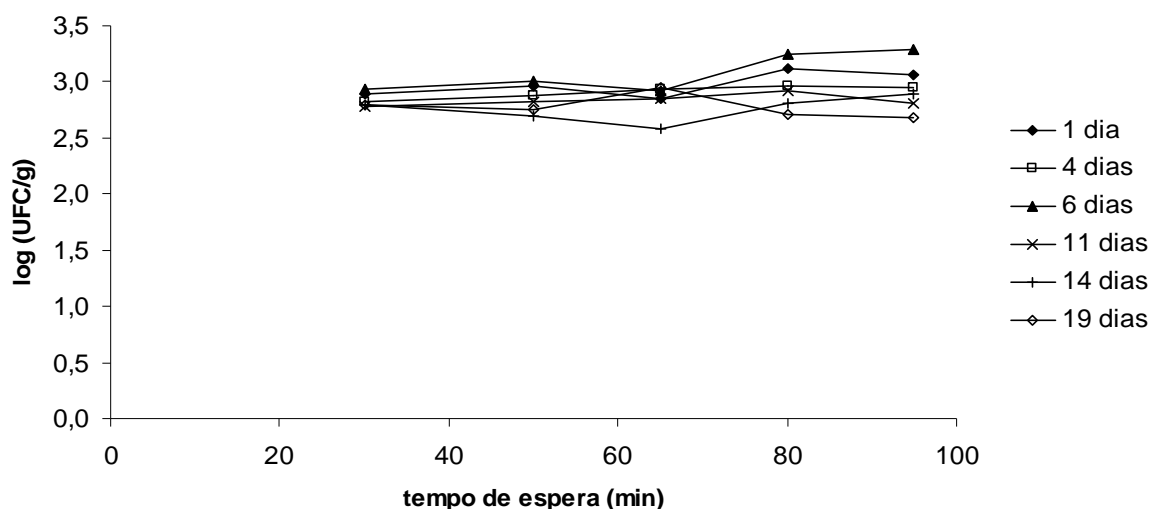


Figura 31. Variação carga microbiana do chili de carne, tendo em conta os tempos de espera sofridos, na 2ª amostragem.

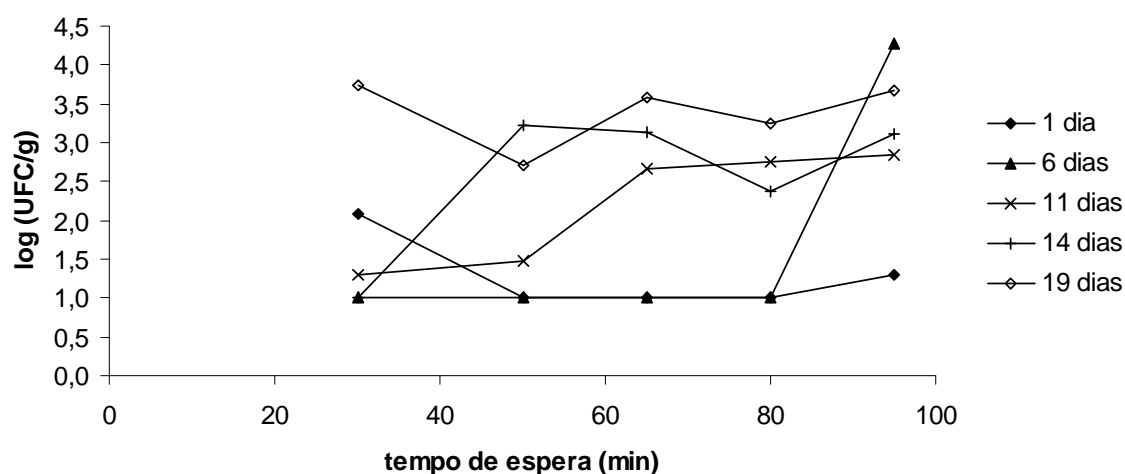


Figura 32. Variação carga microbiana do arroz, tendo em conta os tempos de espera sofridos, na 2ª amostragem.

5.3.2.2 Contagem de *Enterobacteriaceae*, Coliformes, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* coagulase positivo

Não se verificaram contagens de enterobactérias, coliformes e *E. coli* nas amostras estudadas da refeição de “Chili de Carne com Arroz Branco”, referentes às amostras retiradas na 2ª amostragem. Os resultados para presença de *S. aureus* também foram

negativos. Estes resultados são coerentes com o historial de análises da empresa, relativamente a esta refeição.

5.4 Efeito do tempo de espera entre a cocção e o doseamento da refeição

Terceira Amostragem

5.4.1 Variação de temperatura após a cocção da refeição

A amostragem 3 teve como objectivo confirmar os resultados obtidos na amostragem 2, para tal foi efectuada, tanto quanto possível, nas mesmas condições. As quantidades usadas para as amostras foram iguais às usadas numa situação real de doseamento da empresa, tal como na amostragem 2 mas, devido à implementação de uma nova linha de doseamento e selagem das cuvets a máquina usada foi diferente.

A implementação desta nova linha de processamento, e o facto de esta estar a ser ainda optimizada aquando da realização desta amostragem, levou a que os tempos de cocção do chili fossem muito superiores, devido às esperas causadas, e impediu também o efectuar de amostras com os mesmos tempos de espera da amostragem 2. O planeamento efectuado previamente foi sendo alterado em simultâneo com a amostragem devido às limitações técnicas que foram surgindo.

Na figura 33 está representada a variação de temperatura que os constituintes da refeição sofreram, nestas condições.

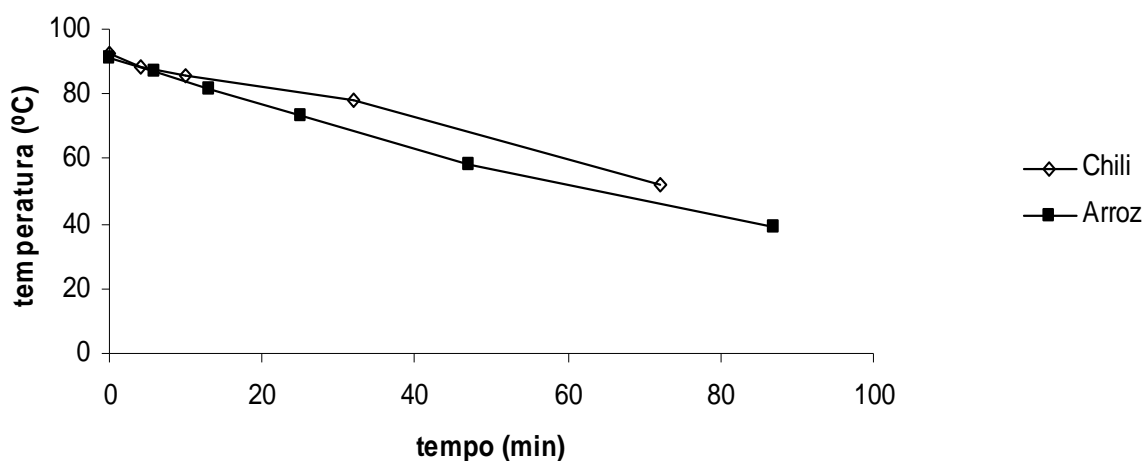


Figura 33. Variação de temperatura durante a espera, das partes integrantes da refeição, entre o término da cocção e o doseamento das cuvets, na 3ª amostragem. Temperatura medida dentro do tabuleiro.

5.4.2 Análises microbiológicas

5.4.2.1 Contagem de microrganismos totais a 30 °C

Na 3ª amostragem as amostras analisadas evidenciaram a evolução microbiana representada nas figuras 34 e 35, relativamente ao chili de carne e ao arroz, respectivamente.

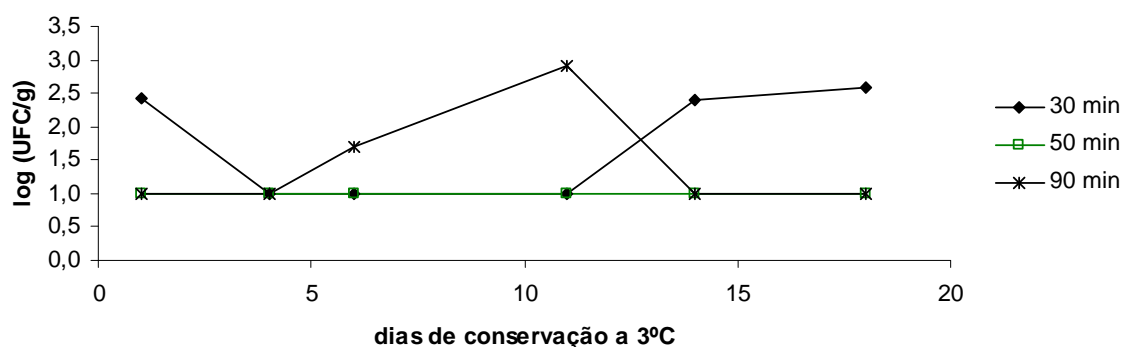


Figura 34. Variação carga microbológica do chili de carne ao longo do armazenamento, considerando amostras com tempos de espera diferentes entre o fim da cocção e o doseamento das cuvets, na 3ª amostragem.

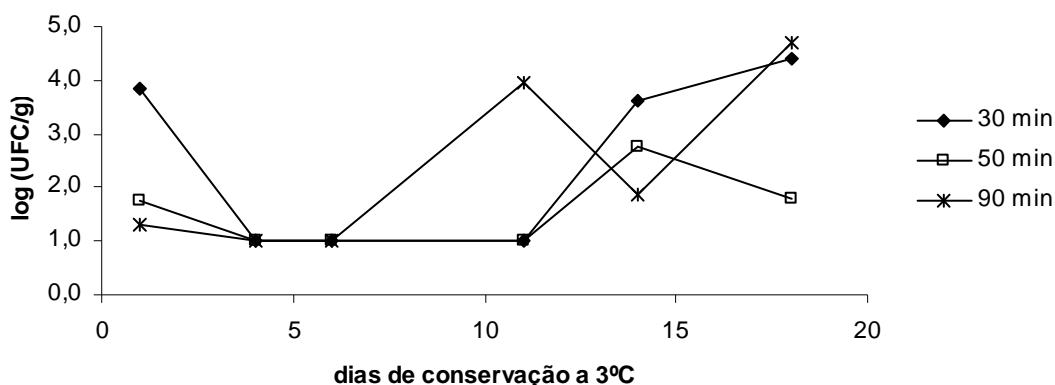


Figura 35. Variação carga microbológica do arroz ao longo do armazenamento, considerando amostras com tempos de espera diferentes entre o fim da cocção e o doseamento das cuvetes, na 3ª amostragem.

Nas figuras 36 e 37 encontra-se a representação dos resultados microbiológicos obtidos para os dois componentes em função do tempo de espera sofrido.

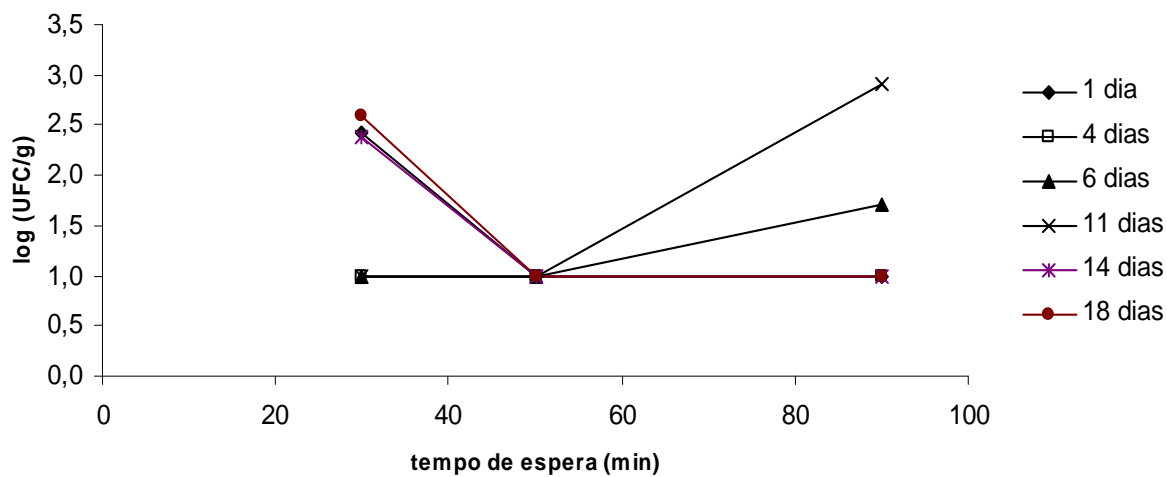


Figura 36. Variação carga microbológica do chili de carne, tendo em conta os tempos de espera sofridos, na 3ª amostragem.

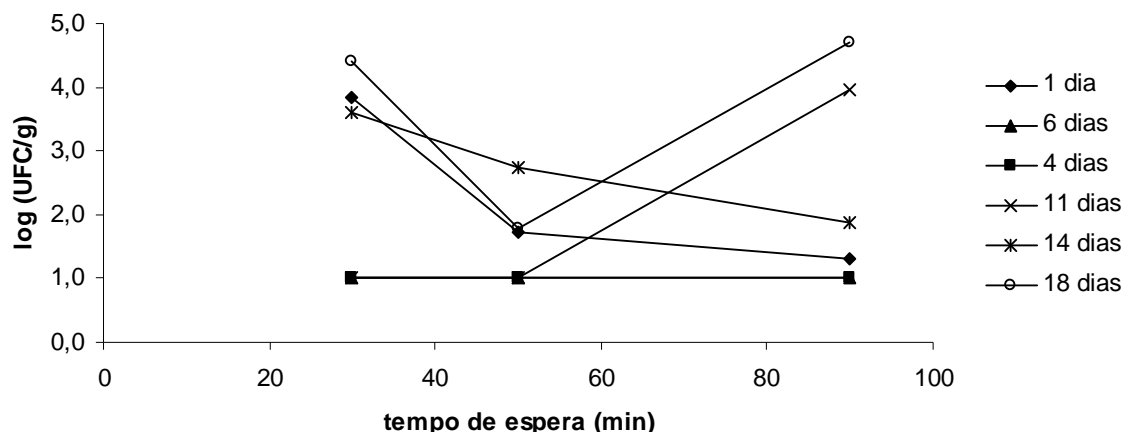


Figura 37. Variação carga microbológica do arroz, tendo em conta os tempos de espera sofridos, na 3ª amostragem.

5.4.2.2 Contagem de *Enterobacteriaceae*, Coliformes, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* coagulase positivo

Não se verificaram contagens de enterobactérias, coliformes e *E. coli* nas amostras estudadas da refeição de “Chili de Carne com Arroz Branco”, referentes às amostras retiradas na 3ª amostragem. Os resultados para presença de *S. aureus* também foram negativos. Estes resultados são coerentes com o historial de análises da empresa, relativamente a esta refeição.

5.5 Efeito do tempo de espera entre a selagem das cuvets e o arrefecimento rápido Quarta Amostragem

Nesta amostragem o tempo de espera a que a refeição foi sujeita foi relativo a outra etapa do fluxograma de produção, neste caso foi considerado o tempo de espera entre o final da selagem das cuvets e a redução rápida de temperatura até 3 °C. De um modo geral, as amostras demoraram cerca de 90 minutos a atingir a temperatura de 3 °C dentro dos armários de redução rápida de temperatura.

5.5.1 Variação de temperatura após o doseamento e selagem das cuvets

Na figura 38 está representada a variação de temperatura que o chilli e o arroz sofreram ao longo do tempo de espera. Apesar de não muito correcta, a representação de tempos de negativos, teve como objectivo mostrar que tal como as demais amostragens, neste caso as preparações também atingiram temperatura superior a 90 °C antes de serem retiradas para tabuleiros.

Considera-se o tempo 0, o instante em que as primeiras cuvets são seladas, as quais são submetidas a redução de temperatura, sem sofrer qualquer tempo de espera.

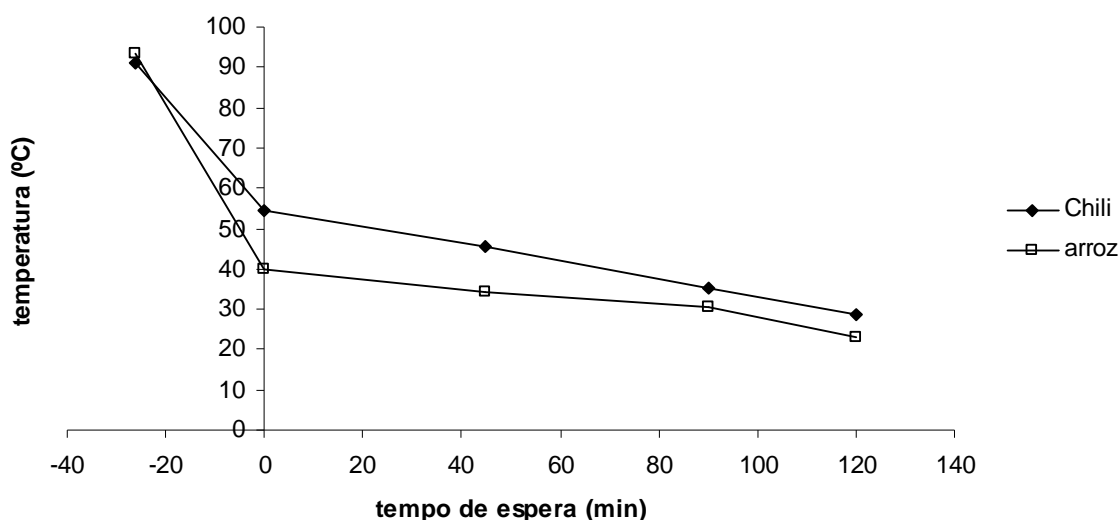


Figura 38. Variação de temperatura durante a espera, das partes integrantes da refeição, entre a selagem das cuvets e a redução rápida de temperatura.

5.5.2 Análises microbiológicas

5.5.2.1 Contagem de microrganismos totais a 30 °C

Na 4ª amostragem verifica-se uma evolução da carga microbiana do arroz vastamente influenciada pelo aumento do tempo de espera a que este é sujeito, como se pode ver na figura 39. O mesmo não se verifica no chili, cuja evolução da carga microbiológica está representada na figura 40.

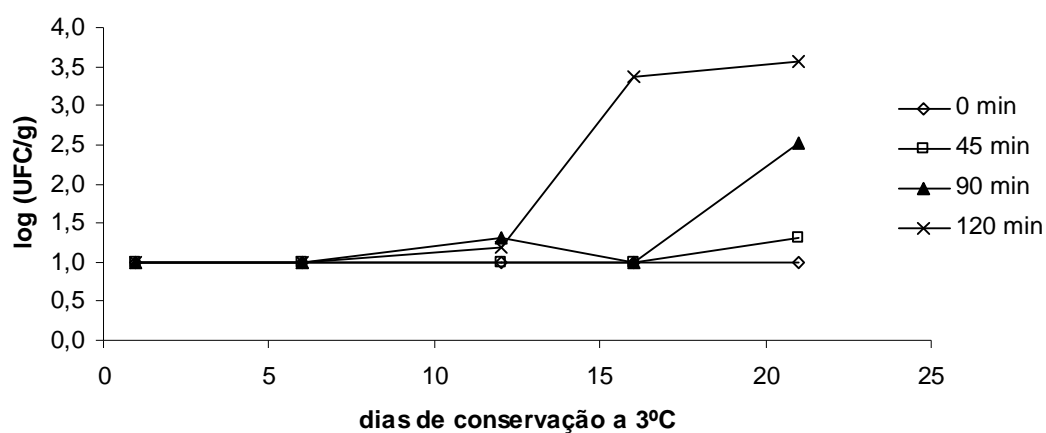


Figura 39. Variação carga microbiana do arroz ao longo do armazenamento, considerando amostras com tempos de espera diferentes entre o a selagem e a redução rápida de temperatura até 3°C.

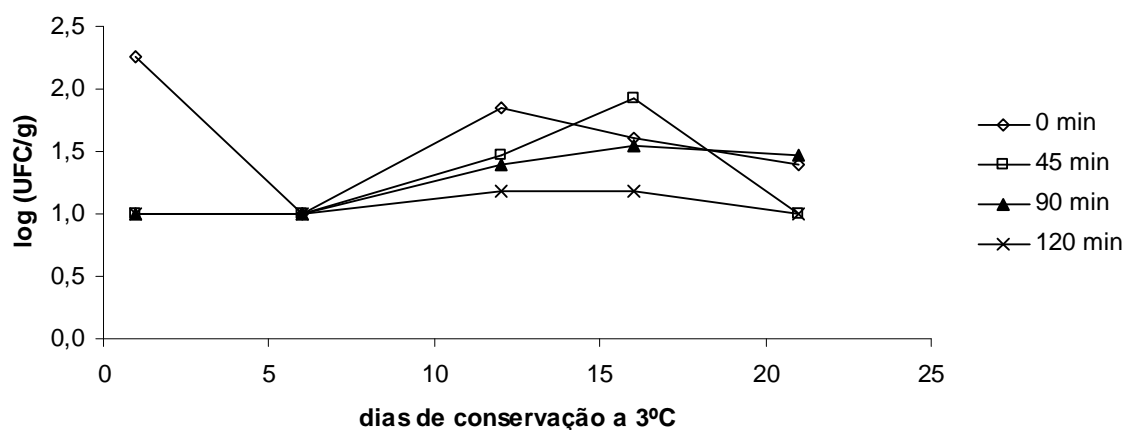


Figura 40. Variação carga microbiana do chili de carne ao longo do armazenamento, considerando amostras com tempos de espera diferentes entre o a selagem e a redução rápida de temperatura até 3°C.

Do mesmo modo que anteriormente, fez-se a representação dos resultados, considerando no eixo das abcissas o tempo de espera, como se pode ver nas figuras 41 e 42.

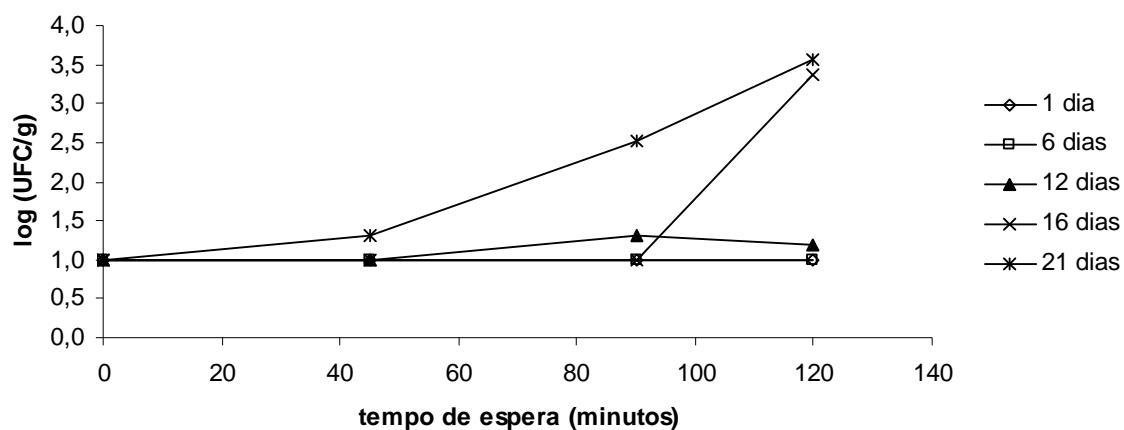


Figura 41. Variação carga microbológica do arroz com o tempo de espera (entre a selagem e o abatimento de temperatura) a que este é sujeito.

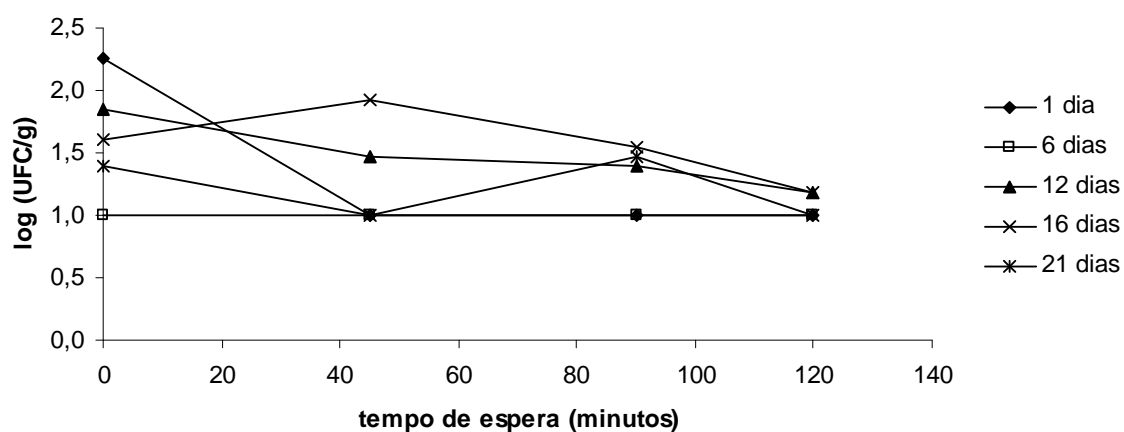


Figura 42. Variação carga microbológica do chili com o tempo de espera (entre a selagem e o abatimento de temperatura) a que este é sujeito.

5.5.2.2 Contagem de *Enterobactereaceae*, Coliformes, *Escherichia coli* e *Staplylococcus aureus* coagulase positivo

Não se verificaram contagens de enterobactérias, coliformes e *E. coli* nas amostras estudadas da refeição de “Chili de Carne com Arroz Branco”, referentes às amostras retiradas na 4ª amostragem. Os resultados para presença de *S. aureus* também foram

negativos. Estes resultados são coerentes com o historial de análises da empresa, relativamente a esta refeição.

5.6 Diminuição de Temperatura da Refeição ao Longo do Tempo de Espera

Como se pode verificar na figura 43, em todas as amostragens os componentes da refeição foram retirados após atingirem temperaturas acima dos 90 °C.

Assim sendo, considerando que o chili e o arroz são retirados para tabuleiros após atingirem uma temperatura superior a 91 °C, são necessários cerca de 50 minutos para que atinjam temperaturas abaixo de 63 °C, isto é, existe uma margem de segurança de 50 minutos até que as preparações entrem no intervalo de temperaturas de risco (5 a 63 °C). Isto tendo em conta os resultados da 2 e 3 amostragens, que foram feitas nas mesmas condições e em condições semelhantes a uma situação real de produção, logo os resultados podem ser extrapolados para aplicação na produção ao nível da empresa, afim de minimizar os riscos com a segurança do produto. No caso da 1 amostragem, a diminuição de temperatura é maior e mais rápida uma vez que, como o referido anteriormente, neste caso as quantidades de produto eram menores.

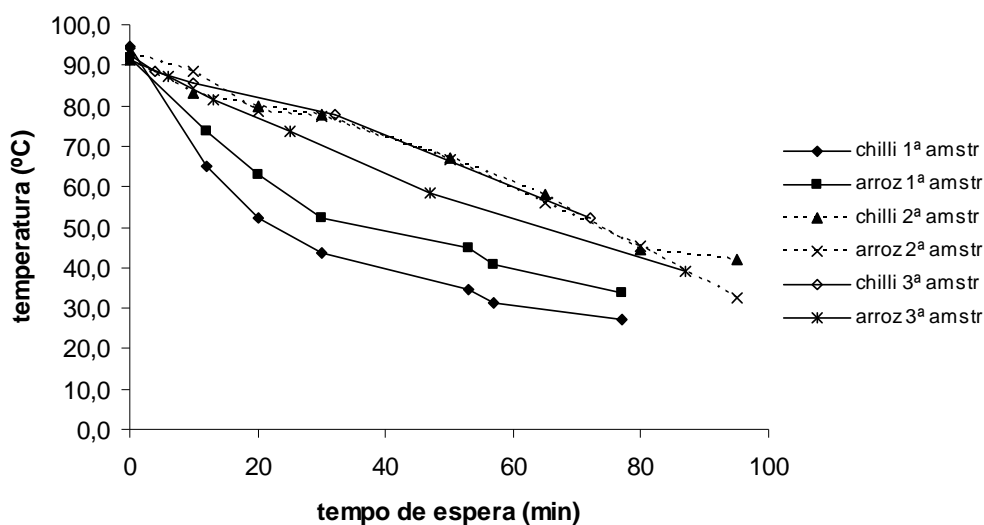
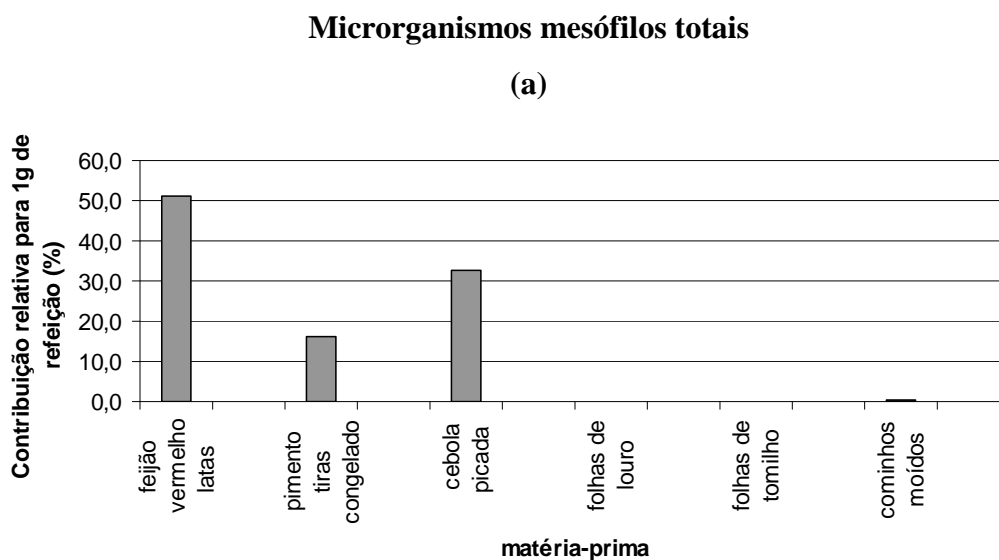


Figura 43. Diminuição de temperatura do chili e do arroz, ao longo do tempo de espera entre o fim da cocção e a o doseamento das cuvets, nas amostragens 1, 2 e 3.

5.7 Contribuição Relativa das Matérias-Primas para o Produto Final em Termos de Contaminação

Dado que as matérias-primas analisadas foram dos mesmos lotes usados na produção dos lotes de refeição estudados, a extrapolação de resultados em termos de contribuição relativa de cada uma das matérias-primas por grama de refeição completa é possível de determinar.

Visto isto, e tendo presentes os resultados apresentados anteriormente, relativos à carga microbiológica total mesófila presente nas matérias-primas e em cada um dos lotes estudados, calculou-se a contribuição relativa de cada uma das matérias-primas para a contaminação do produto final. Os resultados são apresentados sob a forma de percentagem de contribuição por grama de refeição completa e são visíveis na figura 44. Na 1ª amostragem, não foi possível a determinação no número de UFC/g na carne picada, apesar das diluições feitas.



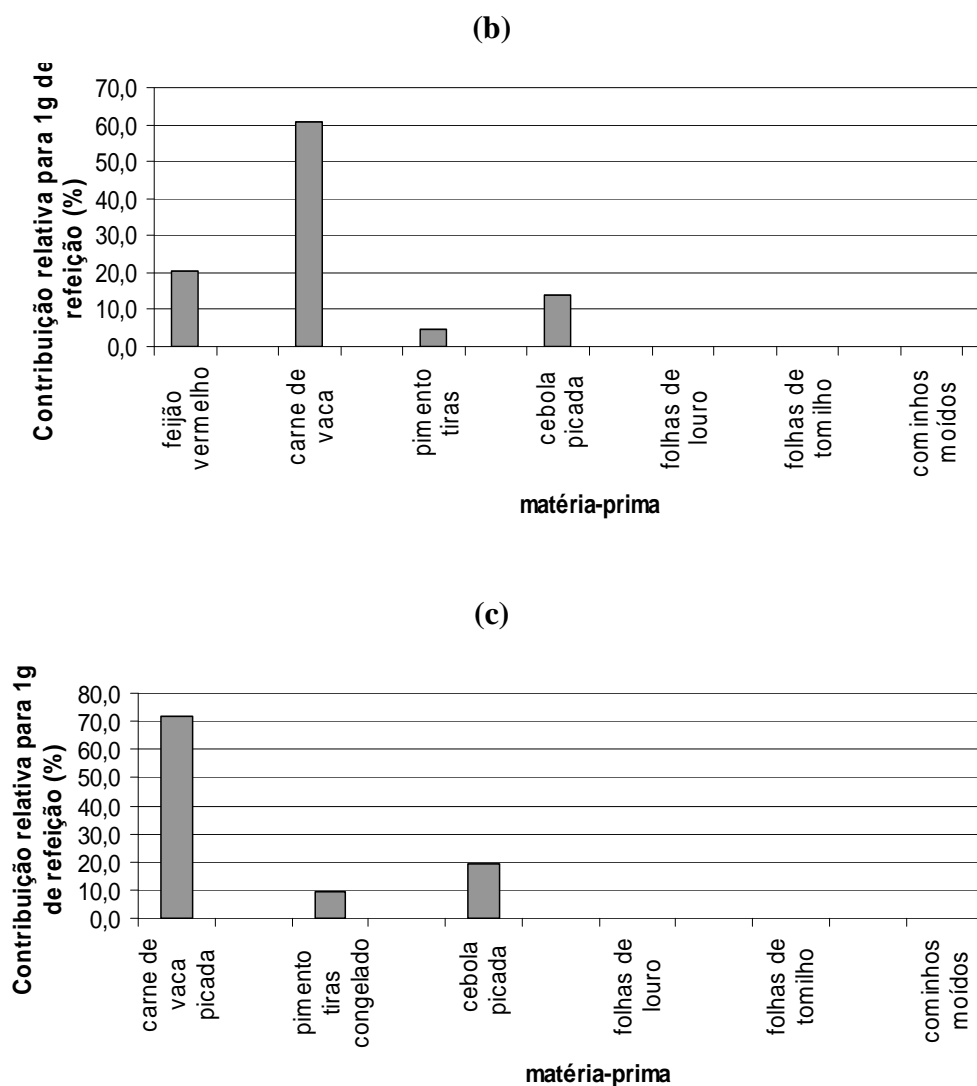


Figura 44. Contribuição relativa (%), em termos de contaminação total, por grama de refeição completa (a) 1ª amostragem, (b) 2ª amostragem e (c) 3ª amostragem.

Como se pode ver nos gráficos, e como era esperado dada a natureza da matriz, a carne picada apresenta-se como a matéria-prima mais preocupante, tendo uma contribuição relativa entre 60 e 70 % para a contaminação do produto final.

5.8 Análises físico-químicas

5.8.1 Determinação da a_w

Na figura 45, estão os valores de actividade de água medidos em amostras retiradas na 2^a, 3^a e 4^a amostragens, uma vez que nestas as condições de amostragem foram semelhantes. No caso da 1^a amostragem as quantidades de produto nas cuvetes eram bastante menores e por isso não passíveis de comparação com as demais.

As determinações foram feitas em condições de temperatura que variaram entre 24 e 24.5 °C, e os valores representados dizem respeito à média de 3 réplicas e respectivo desvio padrão. Como se mostra na figura 45 os valores de a_w do arroz foram sempre menores que no chili.

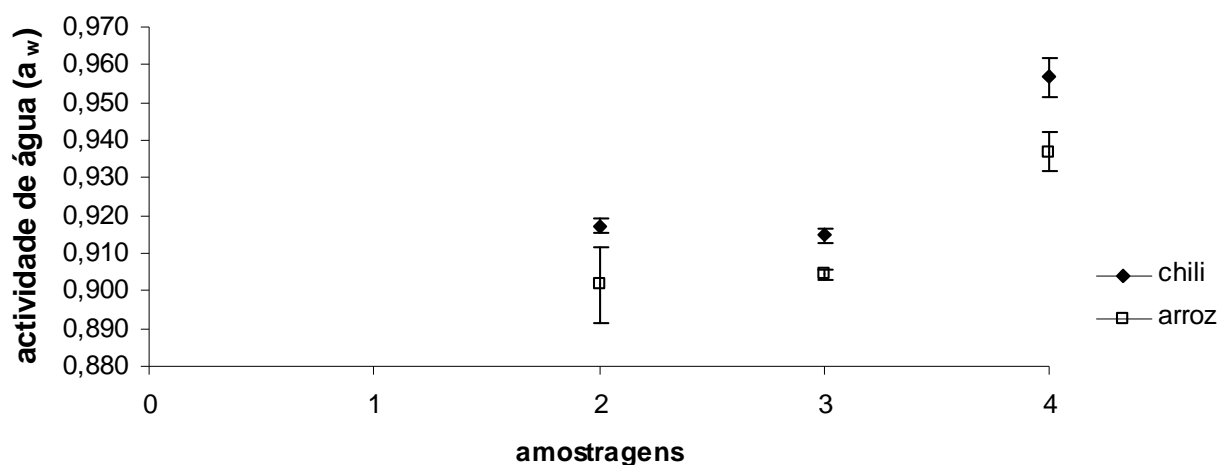


Figura 45. Actividade de água (a_w), medida em cada uma das amostragens representadas.

5.8.2 Determinação do pH

Na figura 46 estão representados os valores de pH das amostragens 2, 3 e 4. Neste caso foram feitas análises a cada um dos componentes e à refeição completa. Foram feitas

3 réplicas, e os resultados apresentados dizem respeito à sua média e respectivo desvio padrão. O chili apresenta valores de pH mais baixos que o arroz.

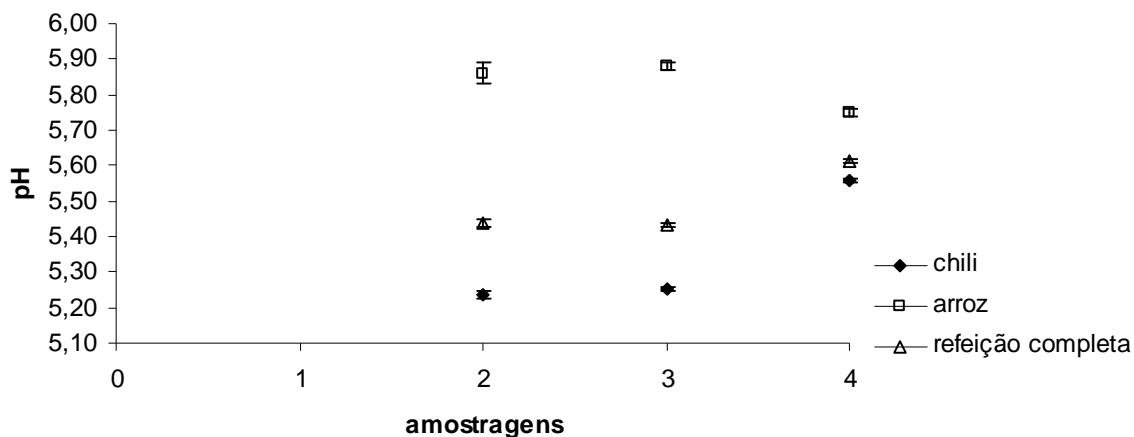


Figura 46. Valores de pH, medidos em cada uma das amostragens representadas.

5.9 Microbiologia Preditiva – ComBase

Com os resultados obtidos, fez-se a aplicação dos mesmos no *software* facultado pelo programa ComBase, afim de se obter as curvas de crescimento ajustadas tendo em conta os modelos possíveis de aplicar aos resultados em causa. Obtiveram-se assim parâmetros como a velocidade máxima de crescimento, o número inicial de microrganismos e o número máximo, através da aplicação do DMFit.

Nem todos os resultados experimentais foram passíveis de aplicação, uma vez que não se ajustavam a nenhum dos modelos, é o caso por exemplo, dos resultados relativos à matriz do chili, que apenas possibilitam a aplicação do modelo linear, o qual não se revela coerente, dados os elevados erros associados aos parâmetros estimados pelo modelo.

Assim, de seguida estão apresentadas as respostas do DMFit existente no programa ComBase, à aplicação dos resultados experimentais do presente trabalho. Apenas estão representados os casos em que houve resposta, na maioria dos casos o programa dá como resposta uma mensagem de erro “*Data not consistent with model selected*”, uma vez que nenhum dos modelos que considera se adequa, ainda que com elevados erros, aos dados experimentais obtidos.

Nas figuras 47 a 52 estão representadas respostas do programa, referentes aos resultados experimentais do arroz com 65 minutos de espera entre a cocção e o doseamento das cuvets, na 2ª amostragem, tendo em conta a aplicação dos modelos linear, bifásico sem considerar a fase estacionária, bifásico sem considerar a fase lag, tri-linear e por último da aplicação do modelo completo de Baranyi e Roberts e deste sem considerar a fase estacionária, respectivamente.

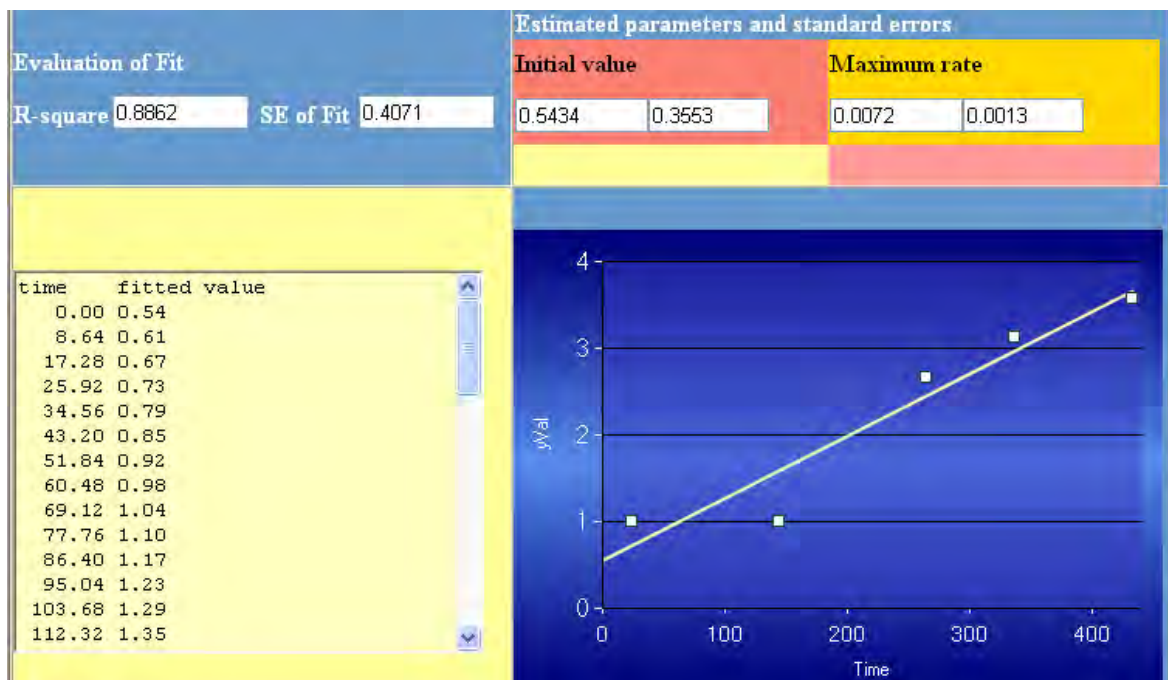


Figura 47. Resposta da aplicação do DMFit aos resultados experimentais do arroz com 65 minutos de espera entre o fim da cocção e o doseamento das cuvets, da 2ª amostragem, aplicando o modelo Linear.

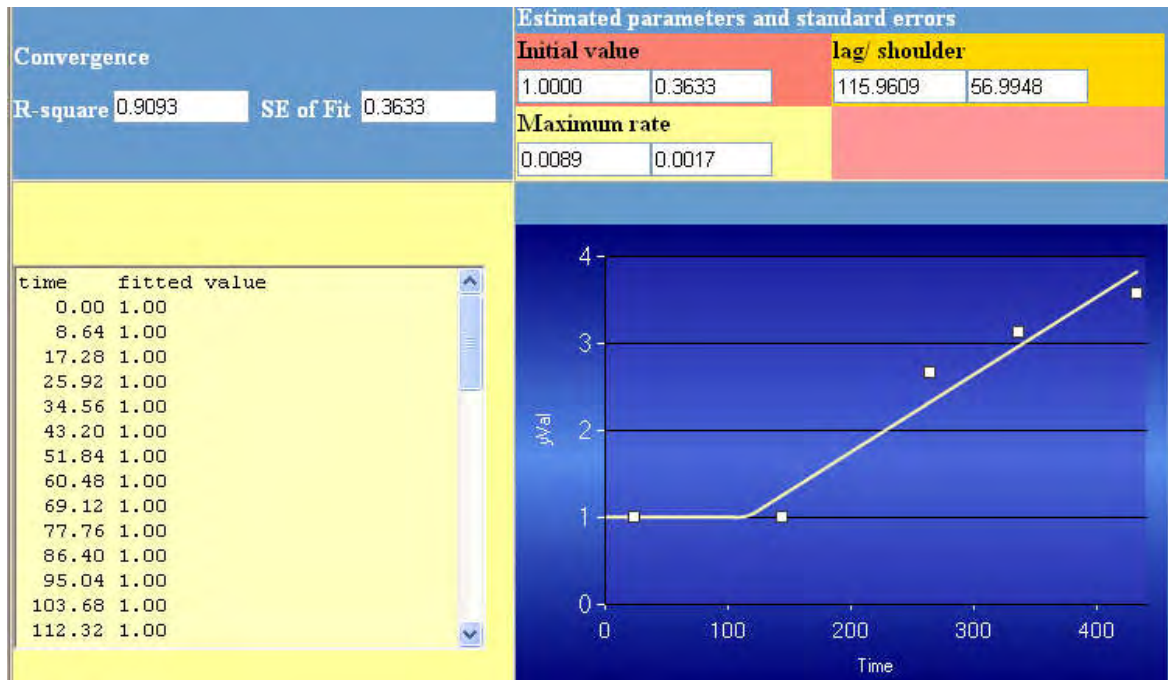


Figura 48. Resposta da aplicação do DMFit aos resultados experimentais do arroz com 65 minutos de espera entre o fim da cocção e o doseamento das cuvetes, da 2ª amostragem, aplicando o modelo Bifásico sem considerar a fase estacionária.

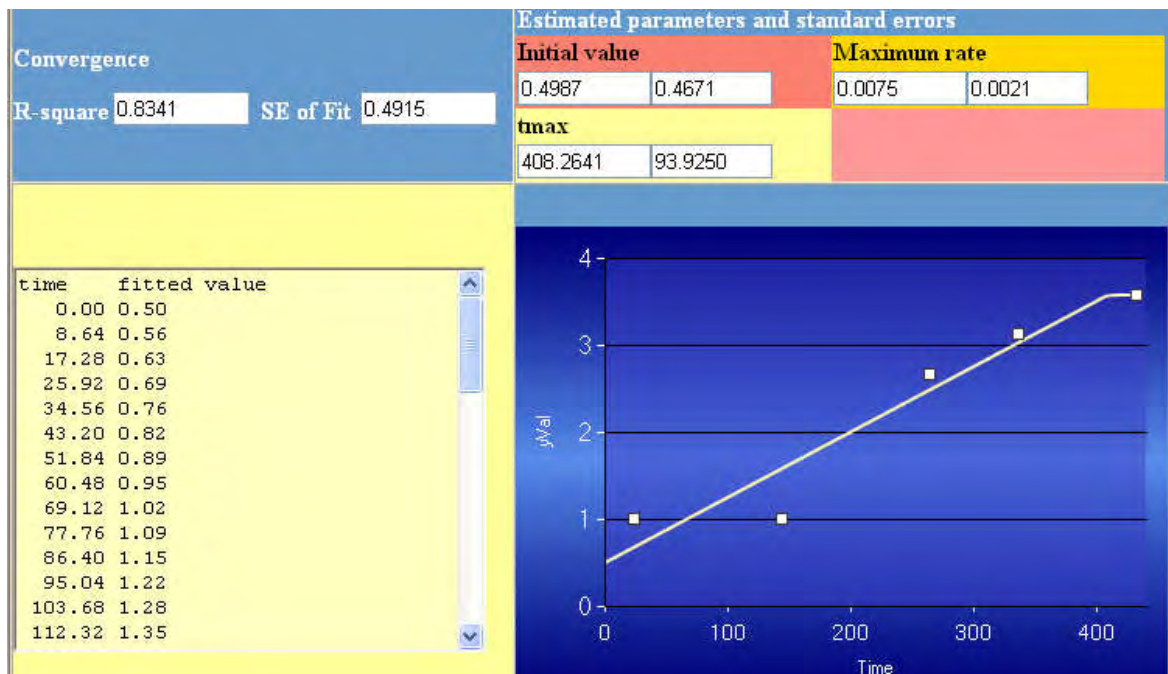


Figura 49. Resposta da aplicação do DMFit aos resultados experimentais do arroz com 65 minutos de espera entre o fim da cocção e o doseamento das cuvetes, da 2ª amostragem, aplicando o modelo Bifásico sem considerar a fase lag.

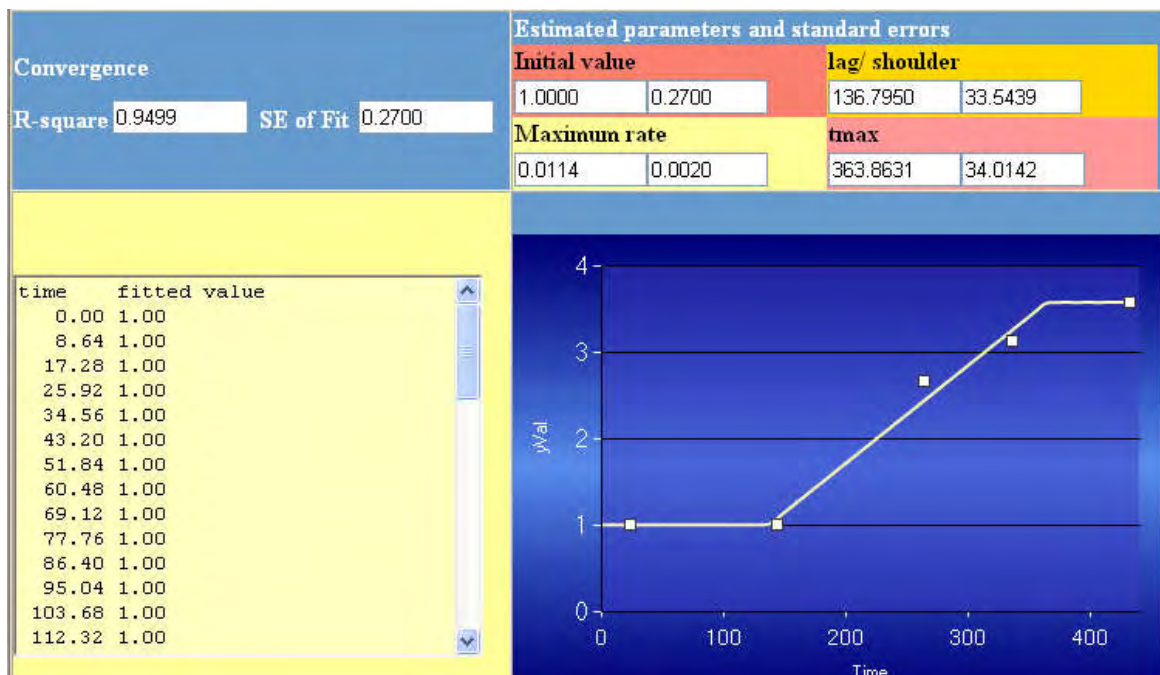


Figura 50. Resposta da aplicação do DMFit aos resultados experimentais do arroz com 65 minutos de espera entre o fim da cocção e o doseamento das cuvetes, da 2ª amostragem, aplicando o modelo Tri-linear.

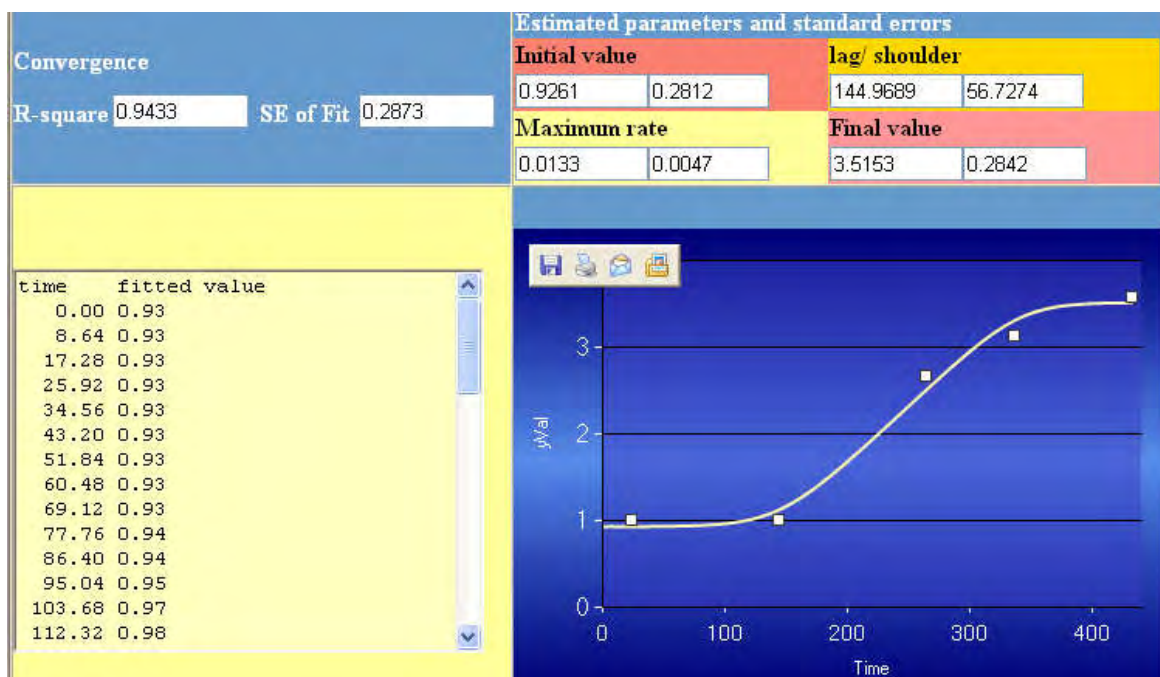


Figura 51. Resposta da aplicação do DMFit aos resultados experimentais do arroz com 65 minutos de espera entre o fim da cocção e o doseamento das cuvetes, da 2ª amostragem, aplicando o modelo completo de Baranyi e Roberts.

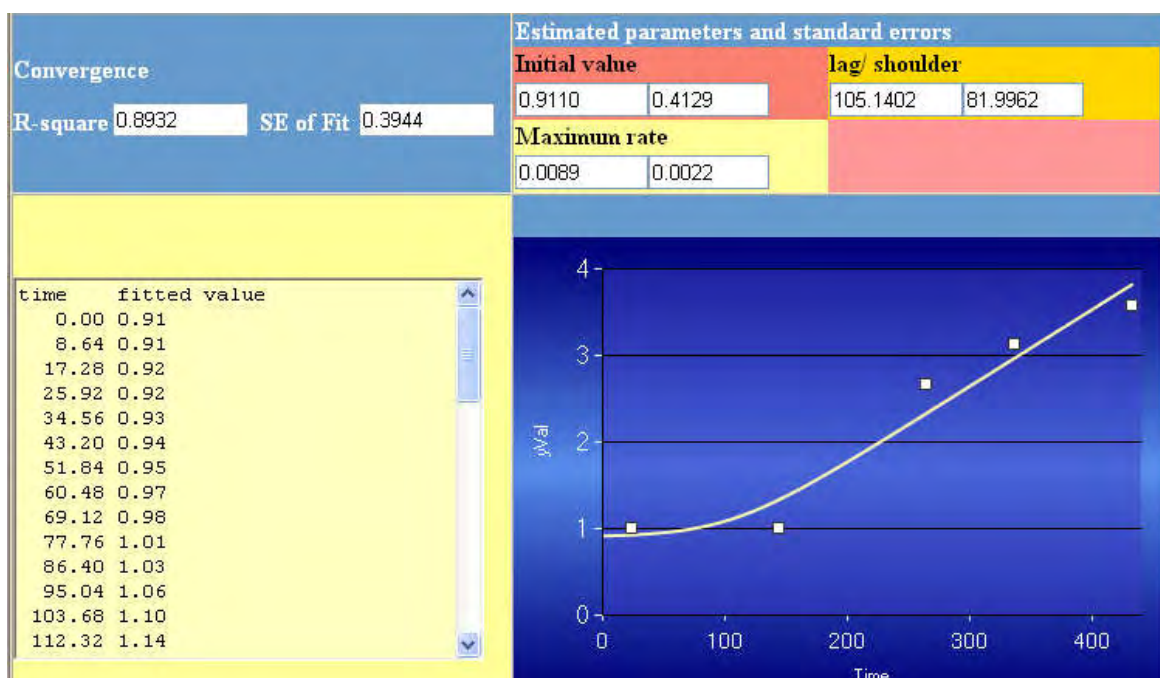


Figura 52. Resposta da aplicação do DMFit aos resultados experimentais do arroz com 65 minutos de espera entre o fim da cocção e o doseamento das cuvets, da 2ª amostragem, aplicando o modelo de Baranyi e Roberts sem considerar a fase estacionária.

Como se pode verificar pela observação das respostas acima, da aplicação dos modelos tri-linear e de Baranyi e Roberts completo, resultam parâmetros semelhantes, nomeadamente no que se refere à velocidade máxima de crescimento, $\mu_{(\text{max})}=0.0114(\pm 0.0022)$ Log(UFC/g)/h e $\mu_{(\text{max})}=0.0133(\pm 0.0047)$ Log(UFC/g)/h, respectivamente. Da aplicação dos restantes modelos aos resultados resultam valores de velocidade máxima menores, com erros associados mais significativos, o que leva a crer, que a aplicação dos modelos tri-linear e do modelo completo de Baranyi e Roberts se adequa melhor aos resultados experimentais, neste caso.

Do mesmo modo aplicaram-se os modelos aos resultados experimentais obtidos para as amostras de arroz com 80 minutos de espera entre o final da cocção e o doseamento das cuvets, relativas à 2ª amostragem. Apresentam-se de seguida as respostas obtidas.

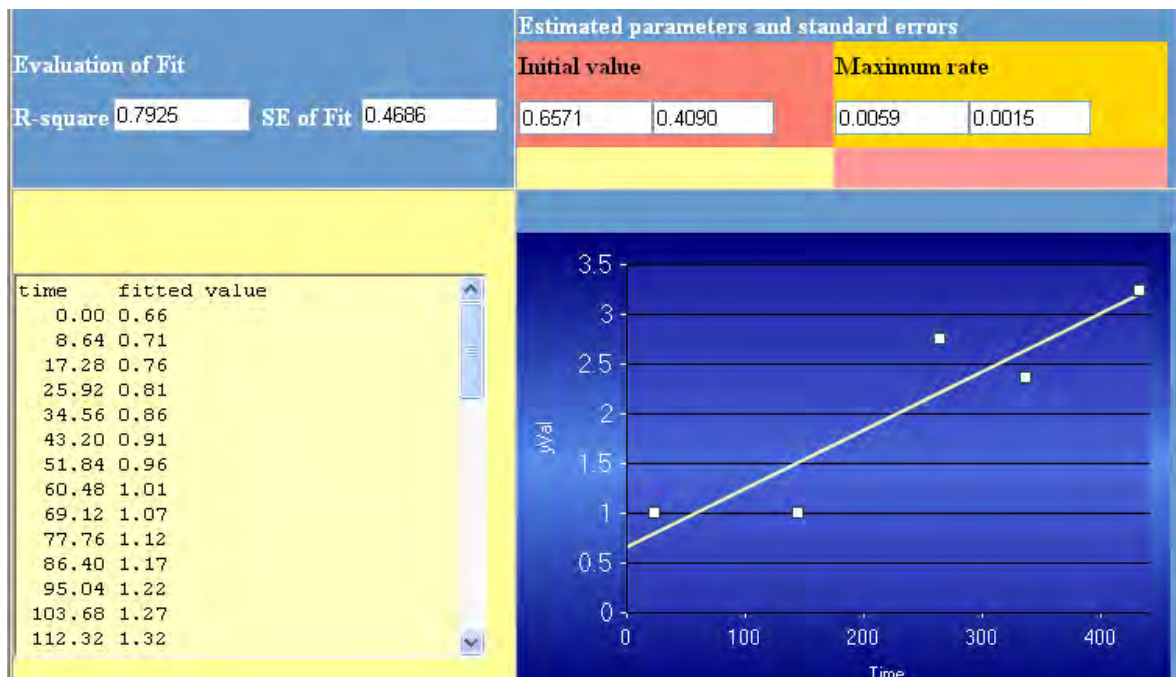


Figura 53. Resposta da aplicação do DMFit aos resultados experimentais do arroz com 80 minutos de espera entre o fim da cocção e o doseamento das cuvetes, da 2ª amostragem, aplicando o modelo Linear.

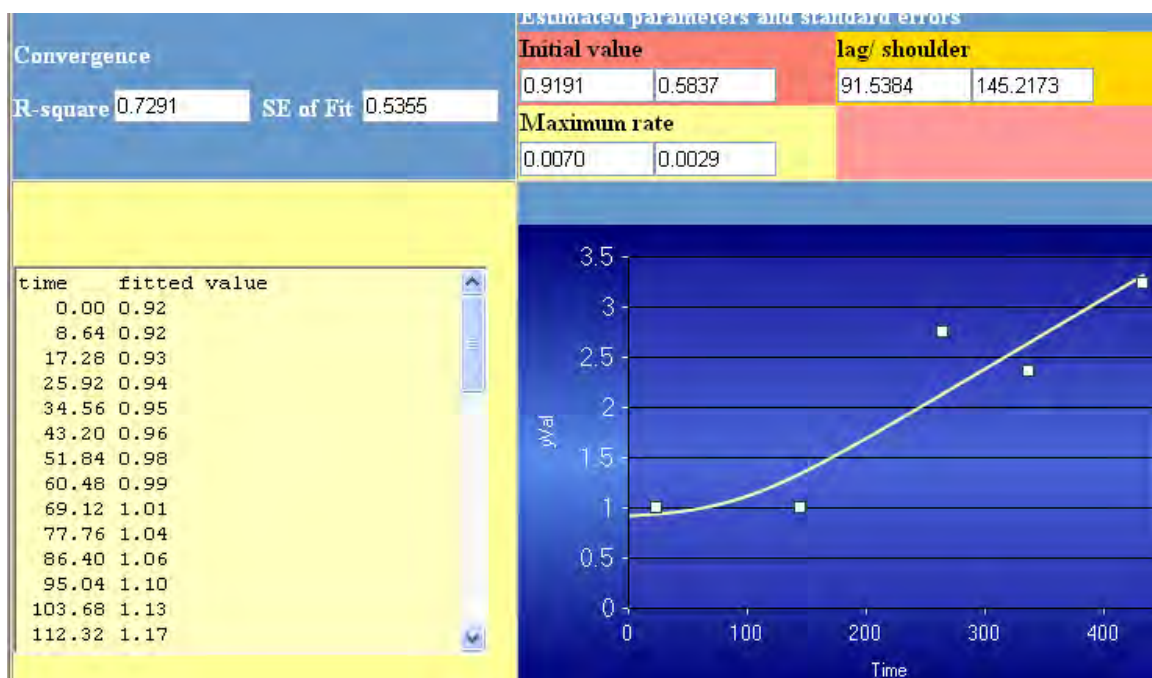


Figura 54. Resposta da aplicação do DMFit aos resultados experimentais do arroz com 80 minutos de espera entre o fim da cocção e o doseamento das cuvetes, da 2ª amostragem, aplicando o modelo de Baranyi e Roberts sem considerar a fase estacionária.

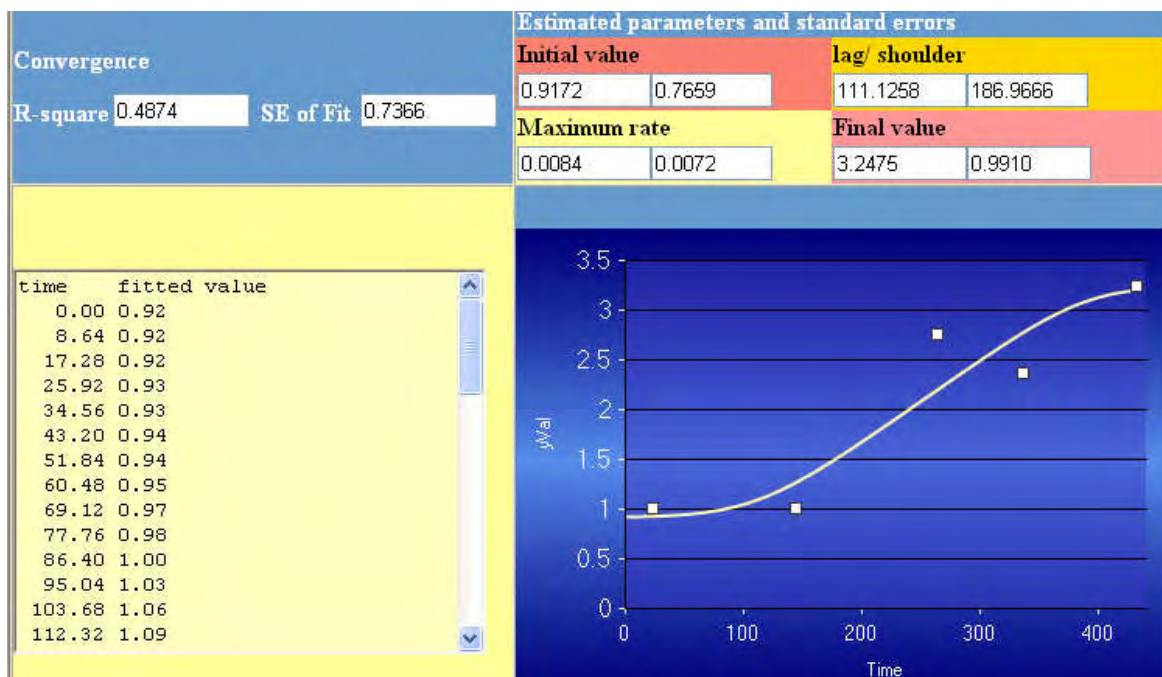


Figura 55. Resposta da aplicação do DMFit aos resultados experimentais do arroz com 80 minutos de espera entre o fim da cocção e o doseamento das cuvetes, da 2ª amostragem, aplicando o modelo completo de Baranyi e Roberts.

Neste caso, como se pode verificar, os erros associados aos parâmetros estimados pelo programa são bastante elevados, o que mostra que apesar de haver resposta por parte deste último na aplicação de alguns dos modelos, estes não se revelam adequados aos resultados experimentais em causa.

Como exemplo, apresenta-se de seguida o resultado obtido para o chili com 30 minutos de espera entre a cocção e o doseamento, em relação à aplicação do DMFit aos resultados experimentais. Neste caso, apenas o modelo Linear dá resposta, a qual está representada na figura 56. Verifica-se um valor de erro associado ao valor estimado de velocidade máxima de crescimento bastante elevado, o que leva a crer que o modelo não se adequa aos resultados.

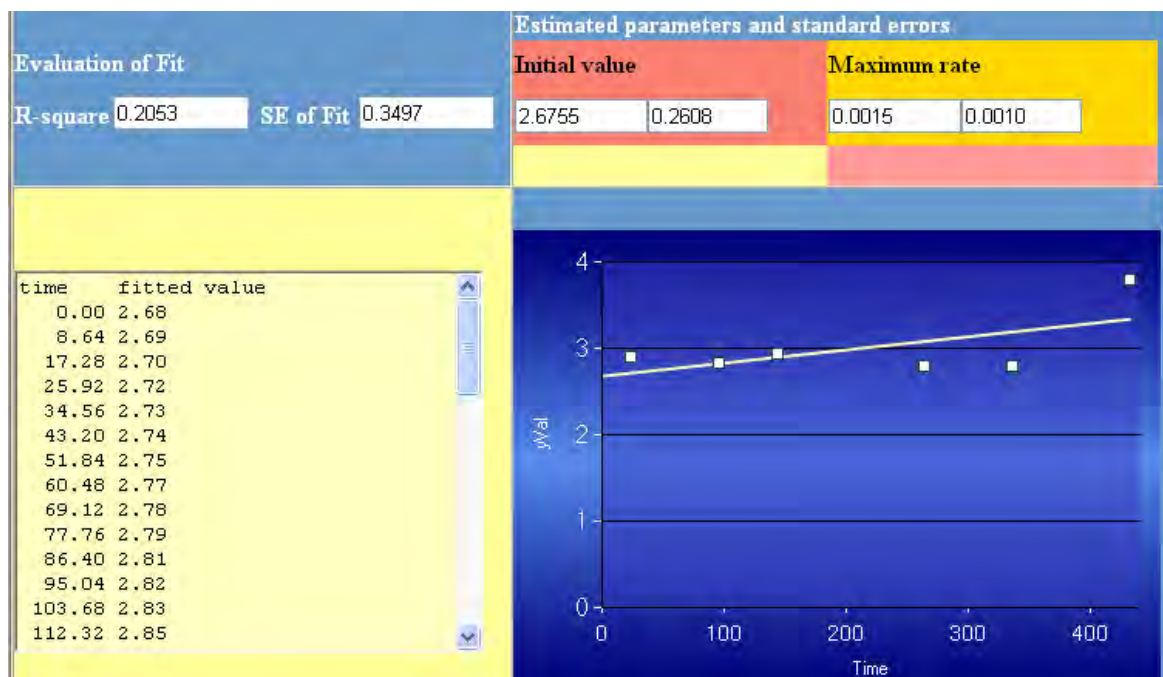


Figura 56. Resposta da aplicação do DMFit aos resultados experimentais do chili com 30 minutos de espera entre o fim da cocção e o doseamento das cuvetes, da 2ª amostragem, aplicando o modelo Linear.

6

Conclusão

6. Conclusão

Actualmente, a diversidade de técnicas disponíveis e outras potenciais para a conservação e consequente aumento da vida útil dos géneros alimentícios é grande, e tem sido alvo de grande interesse e desenvolvimento. As técnicas emergentes na sua grande maioria são menos agressivas, indo ao encontro do interesse do consumidor moderno na procura de produtos seguros mas mais naturais. Estas têm a sua eficácia no facto de destabilizarem os diversos mecanismos homeostáticos utilizados pelos microrganismos para ultrapassarem factores ambientais de stress. É importante ter presente que a resposta microbiana a um factor de stress pode levar a uma tolerância acrescida a esse factor ou mesmo a outros factores inibitórios. No caso de microrganismos patogénicos a resposta ao stress submetido pode levar a alterações de virulência. Daqui resulta a preocupação acrescida que se deve ter no desenvolvimento e aplicação de técnicas de conservação menos agressivas, pois os microrganismos ultrapassam com maior facilidade os stresses impostos, dado que estes são menos agressivos. Este facto apoia a viabilidade da utilização da técnica de barreiras, assim apesar dos factores causadores de stress serem menos

agressivos, a actuação de forma conjunta de diversos factores de stress (barreiras) resulta numa forma de conservação eficaz.

Tendo presente esta situação, os potenciais riscos de segurança alimentar, são um factor limitante para a aceitação em larga escala da tecnologia “Cook-chill”. O facto da cadeia do frio sofrer ainda muitas falhas, torna imperativa a utilização de outras barreiras combinadas com o controlo da temperatura, de forma a garantir a segurança do produto final.

Relativamente ao trabalho desenvolvido, o estudo foi feito de forma adaptada à refeição em estudo, “Chili de carne com arroz branco”, às possibilidades e recursos disponíveis e ao funcionamento em termos de produção da empresa Pascoal & Filhos, S.A..

As amostras “Cook-chill” estudadas revelaram valores satisfatórios de qualidade microbiológica nas contagens de microrganismos mesófilos (a 30 °C), durante o período de vida útil estipulado para a refeição (7 dias).

Verificou-se que para esta refeição, o tempo necessário para que os componentes da refeição entrem na gama de temperaturas de risco (5 a 63 °C), após o final da cocção, é de 50 minutos. Pode considerar-se este período de tempo, como margem de segurança, a que o produto pode ser submetido em termos de espera até ser doseado, garantindo que é retirado da cocção após atingir uma temperatura superior a 91 °C, sem que se verifiquem riscos inadmissíveis em termos de crescimento microbiológico.

Assumindo que a refeição é armazenada a 3 °C, sem que haja quebras na cadeia de frio, a evolução na carga microbiana do chili não sofre alterações significativas, mantendo-se inferior ou igual a 10^3 UFC/g durante um período de 18 dias de conservação. No caso do chili o tempo de espera que este sofre antes de ser doseado não parece ter influência significativa na evolução da carga microbiana.

No que se refere ao arroz, os resultados indicam que é uma matriz menos estável, na medida em que se verificam alterações significativas na carga microbiana ao longo dos 18 dias de conservação estudados. Em termos de carga microbiana inicial, esta apresenta valores que rondam 10^1 UFC/g e atinge valores de 10^3 a 10^4 UFC/g ao fim dos 18 dias de conservação a 3 °C.

Uma explicação possível para estes resultados pode residir na natureza da população microbiana de cada uma das matrizes. No caso do Chilli, o pH ligeiramente mais baixo associado a uma actividade da água mais elevada (o valor medido

experimentalmente é mais baixo que o esperado, possivelmente por limitações do higrómetro usado) indica que as temperaturas durante a cocção causam danos nos microrganismos (quanto maior a actividade da água maior é a susceptibilidade dos microrganismos ao efeito da temperatura), os quais não recuperam posteriormente durante a conservação afim de se poderem multiplicar nas condições da matriz, o que explica que a população microbiana, apesar de inicialmente mais elevada que no arroz se mantenha mais baixa ao fim dos 18 dias de conservação.

No arroz, apesar da carga inicial ser mais baixa, as temperaturas/tempo durante a cocção não se revelam suficientemente eficazes para inibir de forma irreversível a multiplicação da flora microbiana. Esta aumenta posteriormente durante a conservação. É possível ainda, no caso do arroz, verificar que o tempo de espera a que este é sujeito antes do doseamento influencia a evolução da carga microbiana. Sendo esta evolução mais rápida à medida que o tempo de espera aumenta. Possivelmente a recuperação da viabilidade dos microrganismos é mais rápida, ficando assim aptos à sua multiplicação.

Relativamente ao estudo do efeito ao tempo de espera entre a selagem das cuvetes e a redução rápida de temperatura, verificou-se que nesta etapa, o tempo de espera tem maior influência na evolução da carga microbiológica, no caso do arroz. Isto é explicado pelo facto de nesta etapa as temperaturas da refeição serem bastante mais baixas, o que aumenta a susceptibilidade ao crescimento microbiano.

Foi possível ainda verificar com os resultados obtidos que o arroz é o componente limitante, para o aumento do tempo de vida útil desta refeição, ainda assim este podia ser estendido para além dos 7 dias estipulados, tendo em conta que seria necessária a realização de estudos de análise sensorial.

No que diz respeito às matérias-primas, sabe-se que a sua qualidade influencia de forma directa a qualidade microbiológica do produto final. De acordo com a bibliografia e com a experiência de produção, se a qualidade microbiológica destas for boa, a sua contribuição em termos de contaminação para o produto final vai ser menor, melhorando-se deste modo a qualidade do produto. No caso desta refeição, verificou-se que a matéria-prima mais relevante é a carne picada, o que era esperado dada a matriz em causa e a sua quantidade na refeição. Ainda assim a sua contribuição não se revela muito preocupante, tendo em conta que as temperaturas de cocção diminuem de forma acentuada esta

contaminação inicial, como se pode verificar pelos valores de carga microbiana do produto final.

No que se refere à aplicação do programa ComBase aos resultados experimentais, este não se revela muito adequado, nas condições testadas, uma vez que independentemente do modelo escolhido para a análise dos resultados, os erros associados aos parâmetros estimados são elevados. Ainda assim foi possível determinar a velocidade máxima de crescimento da flora microbiana mesófila no arroz com um tempo de espera de 65 minutos entre a cocção e o doseamento.

7

Bibliografia

7. Bibliografia

1. James, M. Jay, *Modern Food Microbiology*. Sixth Edition. **2000**, Aspen Publishers, p. 3.
2. Ferreira, Wanda F. Canas; Sousa, João Carlos F.. *Microbiologia*.**1998**, volume 1, Lidel – Edições Técnicas, p.15.
3. *A Simplified Guide to Understanding and Using Food Safety Objectives and Performance Objectives*. **2006**. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF).
4. *Microbiological criteria and HACCP integration*, International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **2008**. Institute of Food Science and Technology Ireland, Volume 2. p. 39.
5. Nicolai, B.M; Van Impe, J.F.. *Predictive Food Microbiology: A Probabilistic approach*.**1996**, Mathematics and Computers in Simulation, 42: 287-292.
6. Regulamento (CE) N.º 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho de 28 de Janeiro de 2002.
7. Regulamento (CE) N.º 2073/2005 da Comissão de 15 de Novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis a géneros alimentícios.

-
8. Real Decreto 3484/2000 de 29 de Dezembro, http://noticias.juridicas.com/base_datos,
acedido a 22 de Outubro de 2009.
 9. Stringer, Mike; Dennis, Colin. *Chilled foods, A comprehensive guide*. 2000, Second
edition, Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC. Cap. 4.
 10. Ramaswamy, Hosahalli; Marcotte, Michèle. *Food Processing, Principles and
Applications*. 2006. Taylor & Francis Group, p. 67.
 11. Gould, W. Grahame. *Methods for preservation and extension of shelf life*. 1996.
International Journal of Food Microbiology, 33: 51-64.
 12. Lee, Sun-Young. *Microbial Safety of Pickled Fruits and Vegetables and Hurdle
Technology*. 2004, Internet Journal of Food Safety, 4: 21-32.
 13. Stinger, Mike; Dennis, Colin. *Chilled foods, A comprehensive guide*. 2000, Second
edition, Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC. Cap. 7.
 14. Tscheuschner, Horst-Dieter (editor). *Fundamentos de tecnología de los alimentos*.
2001. Editorial Acribia, S.A., Cap. 7.
 15. Tscheuschner, Horst-Dieter (editor). *Fundamentos de tecnología de los alimentos*.
2001. Editorial Acribia, S.A., Cap. 7, p. 334.
 16. Food Safety Authority of Ireland. 2006, *Guidance note no.15 – Cook-chill Systems in
the food service sector* (Revision I). Dublin, Ireland.
 17. Ana Gil e Ivonne Delgadillo. *Acetatos da disciplina de Segurança e Qualidade
Alimentar*. 2007- 2008. Cap.3. Universidade de Aveiro.
 18. Stinger, Mike; Dennis, Colin. *Chilled foods, A comprehensive guide*. 2000, Second
edition, Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC. Cap. 16.
 19. Doyle, M.Ellin, PhD. *Microbial Food Spoilage – Losses and Control Strategies*. 2007,
Food Research Institute, University of Wisconsin – Madison, p.2.
 20. Kilcast, David; Subamaniam, Persis (Editated by). *The stability and shelf-life of food*.
2000. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC. Cap. 1.
 21. Donnelly, Catherine W., PhD, Microbiological Consultant Martin Mitchell, Certified
Laboratories. *Development of a Refrigerated Foods Association Standardized Protocol for
Determining the Shelf Life of Refrigerated Foods*. 2002, p.2-3.
 22. Marth, H. Elmer. *Extended Shelf Life Refrigerated Foods: Microbiological Quality and
Safety*. 1998, Food Technology, 52 (2): 57-62.

-
- 23.** Mafart, P.. *Food engineering and predictive microbiology: on the necessity to combine biological and physical Kinetics*. **2005**, International Journal of Food Microbiology, 100: 239-251.
- 24.** Silva, Lígia Virgínia Antónia, *Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP), Microbial Safety and Shelf Life of Smoked Blue Catfish (Ictalurus Furcatus)*. **2002**. The Department of Food Science, Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College.
- 25.** Food Safety Authority of Ireland. **2005**, Guidance Note No.18 – *Determination of Product Shelf- Life* Dublin, Ireland.
- 26.** Ferreira, Wanda F. Canas; Sousa, João Carlos F.. *Microbiologia*. **1998**, volume 1, Lidel – Edições Técnicas, p.90.
- 27.** Nakashima, Sueli M.; André, Carmen D. S.; Franco, Bernardette D. G. M., *Revisão: Aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva*. **2000**, Brazilian Journal of Food Technology, 3: 41-51.
- 28.** Ferreira, Wanda F. Canas; Sousa, João Carlos F.. *Microbiologia*. **1998**, volume 1, Lidel – Edições Técnicas, p.91.
- 29.** Baranyi, József. *ComBase: A free internet tool to predict microbial responses to food environments (presented to officers of the Food Standards Agency, UK)*. Institute o Food Research, Norwicch, UK. **2009**.
- 30.** Ferreira, Wanda F. Canas; Sousa, João Carlos F.. *Microbiologia*. **1998**, volume 1, Lidel – Edições Técnicas, p.300.
- 31.** James, M. Jay, *Modern Food Microbiology*. Sixth Edition. **2000**, Aspen Publishers, p. 35-38.
- 32.** Fontana, Anthony J. Jr. (Ph. D). *Water Activity's Role in Food Safety and Quality*. Decagon Devices, Inc., Pullman, Washington, USA.
- 33.** Ferreira, Wanda F. Canas; Sousa, João Carlos F.. *Microbiologia*. **1998**, volume 1, Lidel – Edições Técnicas, p.296-310.
- 34.** Ferreira, Wanda F. Canas; Sousa, João Carlos F.. *Microbiologia*. **1998**, volume 1, Lidel – Edições Técnicas, p.298.
- 35.** McDonald, Karl; Sun, Da-wen.. *Predictive food microbiology for the meat industry: a review*. **1999**, International Journal of Food Microbiology, 52:1-27.
- 36.** McMeekin, T.A.; Olley, J.; Ratkowsky, D.A.; Ross, T.. *Predictive microbiology: towards the interference and beyond*. **2002**, International Journal of Food Microbiology, 73: 395-407.

37. Baranyi, J.; Roberts, T. A.. *Predictive Microbiology – Quantitative Microbial Ecology*. **2004**, Culture, Vol. 25, No. 1.
38. McMeekin, T.A.; Ross, T.. *Predictive Microbiology:providing a knowledge-based framework for change management*. **2002**, Intenational Journal of Food Microbiology, 78: 133-153.
39. Baranyi, J.; Roberts, T. A.. *Predictiive Microbiology – Quantitative Microbial Ecology*. **2004**, Culture, vol 25, No 1.
40. Soboleva, T. K.; Pleasants, A. B.; le Roux, G.. *Predictive microbiology and food safety*. **2000**, International Journal of Food Microbiology, 57: 183- 192.
41. McMeekin, T. A., Olley, J. N., Ross, T., and Ratkowsky, D. A. **1993**, *Predictive Microbiology: Theory and Application*. RSP, Tauton, England.
42. Buchanan, R.L.; Whiting, R.C.; Damert, W.C.. *When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves*.**1997**, Food Microbiology, 14: 313-326.
43. http://ifrsvwwwdev.ifrn.bbsrc.ac.uk/CombasePMP/GP/DMF_HelpC.aspx, acedido a 17 de Outubro de 2009.
44. McKellar, Robin C.; Lu, Xuewen (edited by). *Modeling microbial responses in foods*. **2003**, CRS series in contemporary food science.
45. NP 1828 (1982) – Microbiologia Alimentar. Colheita de amostra para análise microbiológica. IPQ, Lisboa.
46. NP 1829 – Microbiologia Alimentar. Preparação de amostras para análise microbiológica. IPQ, Lisboa.
47. NP 2079 – Microbiologia Alimentar. Regras gerais para análise microbiológica. IPQ, Lisboa.
48. NP 3005 (1985) – Microbiologia Alimentar. Preparação das diluições para análise microbiológica. IPQ, Lisboa.
49. NP 4405 (2002) – Microbiologia Alimentar. Regras gerais para contagem de microrganismos a 30°C. IPQ, Lisboa.

-
- 50.** NP 4137 (1991) – Microbiologia Alimentar. Regras gerais para determinação de *Enterobacteriaceae* sem revitalização. Técnicas do número mais provável (NMP) e de contagem de colónias. IPQ, Lisboa.
- 51.** NP 2164 – Microbiologia Alimentar. Regras gerais para a pesquisa de coliformes.
- 52.** NP 2308 – Microbiologia Alimentar. Regras gerais para a pesquisa de *E. coli*.
- 53.** NP 4396 (2002) – Microbiologia Alimentar. Regras gerais para contagem de *E. coli*. Método corrente. IPQ, Lisboa.
- 54.** NP 4400 – Microbiologia Alimentar. Regras gerais para a contagem de *Saphylococcus aureus* (técnica com confirmação de colónias). IPQ, Lisboa.
- 55.** NP 3277-1 – Contagem de bolores e leveduras a 25°C. IPQ, Lisboa.
- 56.** NP 3441 – Carnes, derivados e produtos cárneos. Determinação do pH. Método de referência. IPQ, Lisboa.

Anexo I

Lista de Definições Relevantes ao Trabalho

Amostra para análise microbiológica	Quantidade de produto a analisar, cujas características são representativas das características globais da amostra em estudo.
Alimentos “Cook-Chill ”	Produtos cozinhados que sofrem de seguida redução de temperatura, armazenados a temperaturas de refrigeração controladas (0 a 3°C), que devem ser reaquecidos imediatamente antes do seu consumo.
Alimento refrigerado	Alimento mantido a baixas temperaturas (acima do ponto de congelação) durante o armazenamento, afim de manter a segurança, qualidade e conformidade durante toda a sua vida útil.
Actividade da água (a_w)	Medida da água disponível nos alimentos para os microrganismos, expressa como o quociente entre a pressão do vapor de água dos alimentos e a pressão do vapor de água pura.
Alimentos perecíveis	Alimentos que se degradam com muita facilidade e, portanto, requerem cuidados especiais e armazenamento. São alimentos de curta duração. (Ex.: leite e derivados, pescado, etc.).
Amostragem	Acção de retirar amostras.
Autoclavagem	Tratamento que mantém o material contaminado a uma temperatura elevada e em contacto com vapor de água, durante um período de tempo suficiente para destruir potenciais agentes patogénicos ou reduzi-los a um nível que não constitua risco (desinfecção por calor húmido). O processo de autoclavagem inclui ciclos de compressão e de descompressão de forma a facilitar o contacto entre o vapor e os resíduos.
Boas práticas de higiene	Conjunto de regras, condições e práticas que asseguram uma adequada higiene pessoal, de modo a não comprometer a segurança ou a inocuidade dos alimentos.

Bolores	Seres microscópicos – Fungos – de aspecto filamentosos que se desenvolvem no solo, no ar, na água e nos alimentos.
Botulismo	O botulismo é uma doença neuromuscular, resultante de uma intoxicação altamente fatal e não-febril, no Homem e em vários animais, por acção de uma neurotoxina produzida por <i>Clostridium botulinum</i> . Esta é uma bactéria do tipo bacilo Gram positivo, anaeróbia (sobrevive na ausência de oxigénio) e formadora de esporos, que, em condições óptimas - pH não ácido, temperatura próxima dos 30°C e ausência de oxigénio - se reproduz rapidamente, produzindo uma das mais poderosas toxinas que se conhecem. As toxinas são produzidas sob uma forma proteica não-tóxica, sendo que a digestão proteolítica que sofrem no estômago as activa. Na forma activa, a toxina actua nas junções neuromusculares, bloqueando a libertação do neurotransmissor acetilcolina, o que origina uma paralisia flácida, devido à ausência de estímulo nervoso. O botulismo alimentar deve-se à acção das toxinas A, B e E, surgindo como consequência da ingestão de alimentos contaminados, geralmente enlatados, conservas ou enchidos, em cujo processo de fabrico ou preparação não foram tidos em conta os devidos procedimentos de esterilização ou de embalagem. Surge normalmente em conservas caseiras ou em refeições congeladas, que foram aquecidas e deixadas depois à temperatura ambiente vários dias. Esta variante, embora sendo a mais frequente no homem, é uma doença esporádica e com pouco impacto em termos de saúde pública, graças à evolução das medidas de assepsia na preparação dos alimentos. A prevenção passa por uma correcta lavagem e esterilização dos alimentos e dos recipientes a usar na elaboração de conservas, devendo estas manter um pH interno baixo, por forma a evitar o crescimento de esporos.
Cocção térmica	Todas as transformações com base química, físico-química e mecânico-estrutural dos componentes dos alimentos, provocada intencionalmente pelo efeito do calor. Tais transformações alteram de forma característica o aroma, sabor, cor e a textura, dependendo das condições de execução do processo e do alimento em questão.

Contaminação Cruzada	Transferência de microrganismos de alimentos contaminados (normalmente não preparados) para os alimentos preparados pelo contacto directo ou indirecto através de um veículo como as mãos, utensílios, equipamentos ou vestuário.
Data de durabilidade mínima	Data até à qual se considera que os géneros alimentícios conservam as suas propriedades específicas nas condições de conservação apropriadas.
Data limite de consumo	Data a partir da qual não se possa garantir que os géneros alimentícios facilmente perecíveis, do ponto de vista microbiológico, estejam aptos para consumo.
Efeito barreira	Efeito causado pela actuação conjunta sobre os factores que afectam o crescimento microbiano (presença de nutrientes, água, pH e oxigénio), limitando a proliferação microbiana.
Especiaria	Uma especiaria é uma substância, extracto ou produto de planta aromática, fresca ou seca, que se junta aos alimentos para lhes conferir sabor aromático ou picante, ou para lhes realçar o sabor próprio. Apesar das vantagens de manterem a integridade do sabor, conterem antioxidantes naturais e apresentarem actividade anti-bacteriana, estes produtos variam na cor e no poder aromatizante e demoram tempo a atingir o equilíbrio com o alimento. Isto é, quando o produto é novo não há uniformidade de sabor, existindo zonas com elevadas concentrações de aroma junto às partículas da especiaria, em detrimento de outras áreas com pouco ou nenhum sabor. Além disto, as especiarias apresentam problemas de armazenagem e estabilidade, já que contêm óleos voláteis que tendem a desaparecer mesmo nas melhores condições de armazenagem.
Esporos	Estrutura resistente das bactérias que se forma para se proteger quando as condições são adversas para a célula normal (célula vegetativa).

Embalamento	Qualquer operação que consista no colocar do alimento em embalagens (embalamento primário – embalagem em contacto directo com o alimento e embalagem secundário – alimento embalado é embalado novamente).
Fases da produção	Transformação e distribuição, é qualquer fase, incluindo a importação, desde a produção primária de um género alimentício até ao seu armazenamento, transporte, venda ou fornecimento ao consumidor final e, quando for o caso, a importação, produção, fabrico, armazenagem, transporte, distribuição, venda e fornecimento de alimentos para animais
Fungos	Fungos são organismos vivos que possuem um núcleo distinto (eucariotes) e que se reproduzem pela formação de esporos. São considerados microrganismos heterotróficos, obtendo a sua alimentação a partir de matéria orgânica inanimada ou nutrindo-se como parasitas de hospedeiros vivos. Incluem leveduras e bolores.
Género alimentício	Qualquer substância ou produto, transformado, parcialmente transformado ou não transformado, destinado a ser ingerido pelo ser. Este termo abrange bebidas, pastilhas elásticas e todas as substâncias, incluindo a água, intencionalmente incorporadas nos géneros alimentícios durante o seu fabrico, preparação ou tratamento. O termo não inclui: alimentos para animais; animais vivos, a menos que sejam preparados; estupefacientes ou substâncias psicotrópicas; medicamentos; produtos cosméticos; tabaco e produtos do tabaco; resíduos e contaminantes.
HACCP	São as iniciais de Hazard Analysis and Critical Control Point ou em português Análise dos Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). Tem como objectivo prevenir a ocorrência de potenciais problemas com a manipulação de alimentos, durante a cadeia alimentar. Para atingir este objectivo é efectuada uma avaliação dos potenciais perigos/riscos associados ao produto ou ao processo, incluindo riscos biológicos (bactérias, fungos, vírus e parasitas), químicos (toxinas, desinfectantes) ou físicos (metais, vidros, etc.). Após identificação dos riscos, devem ser estabelecidos os Pontos Críticos de Controlo, vulgarmente denominados por PCC's. Deste modo serão criados sistemas de monitorização e controlo destes pontos, com a concomitante definição de limites críticos, com vista

a assegurar e minimizar o risco associado aos alimentos.

Higiene alimentar	Todas as condições e medidas necessárias para garantir a segurança e a adequação dos alimentos em todas as fases da cadeia alimentar.
Higiene dos géneros alimentícios	As medidas e condições necessárias para controlar os riscos e assegurar que os géneros alimentícios.
Higienização	Conjunção das actividades de limpeza e desinfeção.
Infecção transmitida por alimentos	Doença que resulta da ingestão de alimentos contendo microrganismos patogénicos vivos.
Infecção mediada por toxina	Doença que resulta da ingestão de alimentos contendo uma determinada quantidade de microrganismos patogénicos capazes de produzir ou libertar toxinas após a ingestão.
Ingrediente	Toda a substância, inclusive aditivo alimentar, utilizada no fabrico ou preparação de género alimentício e presente no produto acabado, eventualmente sob forma modificada.
Intoxicação alimentar	Doença causada por elementos que de forma natural estão envenenados ou contaminados por microrganismos patogénicos.
Legislação alimentar	Disposições legislativas, regulamentares e administrativas que regem os géneros alimentícios em geral e a sua segurança em particular, a nível quer comunitário quer nacional; abrange todas as fases da produção, transformação e distribuição de géneros alimentícios, bem como de alimentos para animais produzidos para, ou dados a, animais produtores de géneros alimentícios
Limite crítico de controlo (LCC)	Valor ou critério que diferencia a aceitação da não-aceitação do processo.
Lote	Conjunto de unidades de venda de um género alimentício produzido, fabricado ou acondicionado em circunstâncias praticamente idênticas.

Manipuladores de alimentos	Qualquer pessoa que manuseie directamente alimentos, embalados ou não, equipamento e utensílios alimentares ou superfícies em contacto com alimentos, que deva por isso cumprir os requisitos de higiene alimentar.
Matéria-prima	Material que é utilizado no processamento de um alimento (inclui ingredientes, aditivos e produtos intermédios).
Mesófilos	Organismos com uma amplitude de temperatura de crescimento entre os 10 °C e os 56 °C, com um óptimo entre os 20 °C e os 46 °C.
Microrganismos	Os microrganismos são seres vivos muito pequenos, com um tamanho compreendido entre alguns milionésimos e alguns milésimos de milímetro. Deles fazem parte os protozoários, alguns bolores, as leveduras, as bactérias e os vírus. Os vírus, devido ao seu pequeníssimo tamanho, são os únicos invisíveis ao microscópio óptico. Muitos microrganismos são parasitas e agentes de doenças contagiosas dos animais e das plantas. A maior parte dos microrganismos ou micróbios, como também são conhecidos, pode viver em meios de cultura artificiais. Alguns microrganismos são úteis para a produção de alimentos e outras substâncias de interesse industrial e para a conservação do meio ambiente. Os vírus são sempre parasitas obrigatórios das células vivas em virtude de não possuírem a capacidade de síntese que outros microrganismos possuem.
Microrganismos aeróbios	Microrganismos que necessitam de oxigénio para se desenvolverem.
Microrganismos aeróbios facultativos	Microrganismos que se conseguem desenvolver quer na presença, quer na ausência de oxigénio.
Microrganismos aneróbios	Microrganismos que requerem a ausência de oxigénio para se desenvolverem.
Microrganismos micro-aerófilos	Microrganismos que necessitam de baixas concentrações de oxigénio para se desenvolverem.

Microrganismos patogénicos	Microrganismos susceptíveis de causarem doenças infecciosas
Não conformidade	Qualquer desvio das normas de trabalho, das práticas, dos procedimentos, dos regulamentos, do desempenho do sistema de gestão, etc, que possa, directa ou indirectamente conduzir a lesões ou doenças, a danos para a propriedade, a danos para o ambiente do local de trabalho, ou a uma combinação destes.
Norma	Documento, estabelecido por consenso e aprovado por um organismo de normalização reconhecido, que define regras, linhas de orientação ou características para actividades ou seus resultados, destinadas à utilização comum e repetida, visando atingir um grau óptimo de ordem, num dado contexto.
Pasteurização	A pasteurização é uma técnica de conservação dos alimentos, nomeadamente de bebidas (especialmente do leite), conseguida pela eliminação dos microrganismos (bactérias) sob acção do calor, de modo a alterar-se o menos possível a estrutura física do produto e as suas propriedades bioquímicas. Existem vários tipos de pasteurização consoante o tempo e a temperatura utilizada: pasteurização prolongada (30 minutos a 62-63°C); pasteurização elevada (1 minuto a 85 °C, em placas aquecedoras); e pasteurização rápida (40 segundos a 71-74°C). Graças à pasteurização, os produtos ficam com poucos microrganismos (só destrói os que são patogénicos deixando o que são benéficos), enquanto que através da esterilização os produtos ficam completamente libertos de todos os microrganismos (tanto patogénicos como benéficos).
Patogenicidade	Capacidade de um microrganismo desencadear uma doença e/ou provocar danos no hospedeiro. Muitos patogénicos provocam doenças mediante uma combinação de: i) toxicidade e invasão; ou ii) toxicidade e capacidade de colonização. No entanto, alguns patogénicos invasivos provocam doenças em resultado de uma reacção anormal do sistema de defesa do hospedeiro.

Perigo (em alimentos)	Agente biológico, químico ou físico presente nos géneros alimentícios ou nos alimentos para animais, ou uma condição dos mesmos, com potencialidades para provocar um efeito nocivo para a saúde
Perigo biológico	Qualquer crescimento inaceitável, ou sobrevivência de bactérias em alimento que possam afectar a sua inocuidade ou qualidade, ou a produção ou persistência de substâncias como toxinas, enzimas ou produtos resultantes do metabolismo microbiano em alimentos.
pH	Índice utilizado para medir a acidez/alcalinidade de uma solução, representa o inverso do logaritmo da concentração do ião H_3O^+ .
Ponto crítico de controle (PCC)	Ponto, procedimento, etapa do processo ou elemento da cadeia alimentar na qual é possível aplicar um controlo que é essencial para prevenir, reduzir a níveis aceitáveis ou eliminar um perigo relacionado com segurança alimentar.
Potencial de oxidação-redução (E^0)	A capacidade de certos substractos de ganhar ou perder electrões. O elemento que perde um electrão é denominado oxidado, e o que ganha, reduzido.
Processos térmicos	Processos segundo os quais os alimentos são sujeitos a determinadas temperaturas com o objectivo de redução ou eliminação da carga microbiana presente no alimento.
Psicotróficos	Organismos que possuem uma amplitude de temperatura de crescimento de -5 °C a 40 °C com um óptimo acima dos 20 °C .
Psicrófilos	Organismos que possuem uma amplitude de temperatura de crescimento de -8 °C a 25 °C com um óptimo inferior a 20 °C .
Refrigeração	A refrigeração consiste num processo de arrefecimento de uma substância e manutenção desta a temperatura inferior à da temperatura atmosférica normal.

Rastreabilidade	Define-se como a capacidade de detectar a origem e de seguir o rasto de um género alimentício, de um alimento para animais, de um animal produtor de géneros alimentícios ou de uma substância, destinados a ser incorporados em géneros alimentícios ou em alimentos para animais, ou com probabilidade de o ser, ao longo de todas as fases de produção, transformação ou distribuição.
Segurança alimentar	Garantia de que o produto não afectará a saúde do consumidor quando processado e/ou consumido de acordo com o seu uso pretendido.
Temperatura mínima de segurança	Temperatura mínima à qual o alimento é submetido durante um período de tempo pré-definido, de modo a garantir a segurança do ponto de vista microbiológico do alimento.
Termófilos	Organismos que tem o seu óptimo de crescimento acima dos 45 °C.
Toxinas	Toxinas são produtos microbianos, formados por moléculas com propriedades tóxicas, capazes de lesar gravemente ou matar, quando administradas - mesmo em pequenas quantidades - num organismo vivo. As toxinas têm uma acção tóxica e antigénica, induzindo alterações funcionais nas células. Funcionam como factores de virulência acrescida, aumentando a capacidade invasora do microrganismo patogénico que a produz, ao entrar num dado hospedeiro. São elaboradas, principalmente por bactérias, mas também por algumas espécies de fungos, algas e protozoários.
Tecnologia de barreiras	Combinação de factores com o intuito de controlar o crescimento microbiano.
Tempo de vida útil	Período durante o qual o alimento mantém a segurança microbiológica e todas as características sensoriais desejadas, quando armazenado a determinada temperatura. Este é determinado através da identificação dos perigos microbiológicos,

aquecimento ou outro método de conservação a que foi submetido, material de embalagem e outros factores de inibição do crescimento microbiológico e de deterioração.

Tscheuschner, Horst-Dieter (editor). *Fundamentos de tecnologia de los alimentos*. Eitorial Acibia, S.A. 2 edição, 2001.

<http://qualfood.biostrument.com>, acedido a 17 de Outubro de 2009

<http://www.chilledfood.org>, acedido a 17 de Outubro de 2009

Anexo II

Especificações técnicas do filme usado na selagem das amostras

	Unit	Nominal values				Test method
FILM DATA		25E		40E		ASTM D-374(C)
Thickness	micron	25		38		
Density	g/cm³	1.4		1.4		
Yield	m²/kg	29.2		19.5		
Length (single wound)	m	1600		1025		
Width (single wound)	mm	160-1000		160-1000		
Core diameter	mm	76 (3 inches)		76 (3 inches)		
MECHANICAL PROPERTIES		L	T	L	T	
Tensile strength	kg/cm²	1835	2234	1835	2234	ASTM D-882
Elongation	%	120	80	120	80	ASTM D-882
SEALING PROPERTIES						
Heat seal strength (film to film)	g/25mm	850		980		140°C/40psi/1sec
Heat seal strength (film to CPET / APET tray)	g/25mm	700		700		180°C/80psi/1sec
BARRIER PROPERTIES						
WVTR	g/m²/24h	20		14		Lissy, 38°C, 90%RH Oxtran, 23°C, 60/70%RH
OTR	cc/m² /atm	75		45		
OPTICAL PROPERTIES						
Haze	%	8		8		ASTM D-1003-61
RECOMMENDED STORAGE CONDITIONS		Recommended maximum temperature for long-term storage: max 32°C, max 80 % R.H., up to one year				
FOOD LAW APPROVAL		Compliance with food contact legislation: DOF 25E & 40E films are approved for food contact in EU and USA				

Anexo III

Composição, características e preparação dos meios de cultura usados no trabalho

Plate Count Agar (PCA)

Este meio não contém nenhum inibidor nem indicador, é usado maioritariamente para determinar a flora microbiana total em água, produtos alimentares e outros materiais.



Composição típica (g/L):

Reagente	Quantidade (g)
Peptona de Caseína	5.0
Extracto de levedura	2.5
D(+)-Glucose	1.0
Agar-Agar	14.0

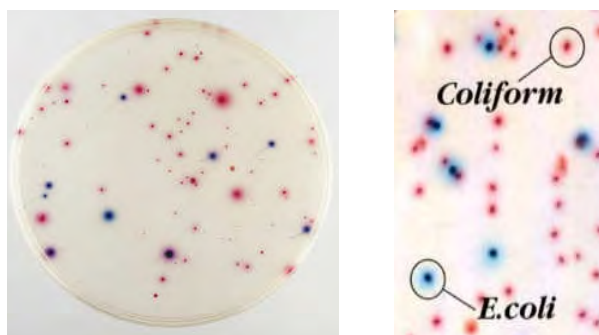
Preparação (Meio desidratado)

1. Dissolver 22.5 g em 1000 mL de água destilada (pH final do meio: 7.0 ± 0.2 a 25°C);
2. Esterilizar no autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Chromocult® Coliform Agar (CCA)

Agar selectivo para a detecção simultânea de coliformes totais e *E. coli* em água e produtos alimentares.

A interacção com as peptonas, piruvato, sorbitol e o tampão fosfato propicia o rápido crescimento das colónias de coliformes, mesmo as injuriadas. O crescimento das bactérias gram-positivas assim como algumas gram-negativas é inibido pelo tergitol, o qual não surte efeito negativo no crescimento das bactérias coliformes. Os constituintes cromogénicos permitem a detecção simultânea dos coliformes totais e de *E.coli*. A enzima β -D-galactosidase causa a cor salmão características das colónias de coliformes. As colónias de *E.coli* aparecem com uma coloração azul escura/violeta, devido à actuação da enzima β -D-glucuronidase sobre substratos específicos.



Composição típica (g/L):

Reagente	Quantidade (g)
Peptones	3.0
Sodium chloride	5.0
Sodium dihydrogen phosphate	2.2
Di-sodium hydrogen phosphate	2.7
Sodium pyruvate	1.0
Tryptophane	1.0
Agar-agar	10.0
Sorbitol	1.0
Tergitol	0.15
Chromogenic mixture	0.4

Preparação (Meio desidratado)

Dissolver 26.5 g em 1000 mL de água destilada previamente autoclavada.

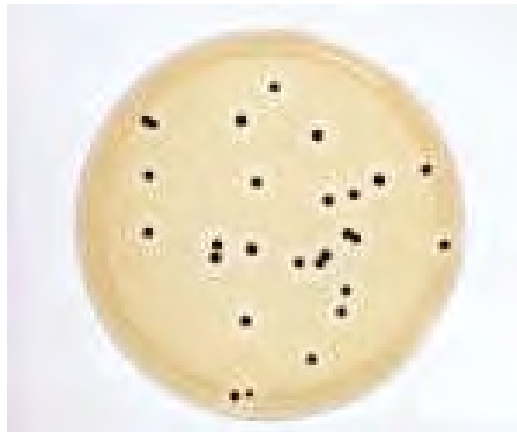
Baird-Parker Agar (Staphylococcus Selective Agar Base - BPA)

Para isolar e diferenciar *Estafilococos* em produtos alimentares e produtos farmacêuticos, segundo BAIRD-PARKER (1962).

Esse meio contém cloreto de lítio e telurito para inibir o crescimento da restante flora microbiana, enquanto o piruvato e a glicina estimulam o crescimento dos *Estafilococos*.

O telurito de potássio, a glicina e o cloreto de lítio actuam como agentes selectivos, a redução do telurito e a hidrólise da gema de ovo, actuam como características diferenciais.

O piruvato de sódio actua como agente reparador das células injuriadas.



Composição típica (g/L):

Reagente	Quantidade (g)
Peptona de caseína	10.0
Extracto de carne	5.0
Extracto de levedura	1.0
Piruvato de sódio	10.0
Glicina	12.0
Cloreto de lítio	5.0
Agar- Agar	15.0
Egg-Yolk tellurite emulsion	50 mL

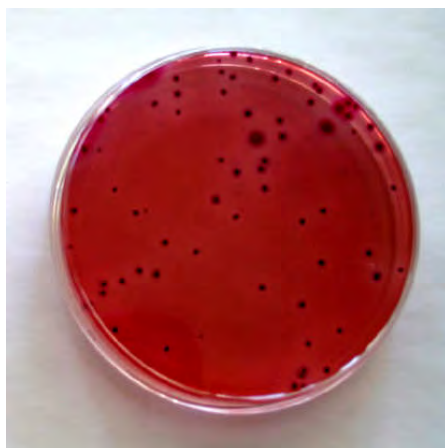
Preparação (Meio desidratado)

1. Dissolver 58.0 g em 950 mL de água destilada;
2. Esterilizar no autoclave a 121°C durante 15 minutos;
3. Adicionar a cada 950 mL, 50 mL Egg-Yolk tellurite emulsion (pH final do meio: 6.8 ± 0.2 a 25°C));

Violet Red Bile Dextrose Agar (VRBD Agar)

Agar selectivo para isolamento e contagem de todas as espécies de *Enterobactereaceae* em produtos alimentares.

O violeta de cristal e os sais biliares inibem de forma acentuada a flora restante. A degradação da glucose é acompanhada pela formação de ácido, a qual é indicada pela mudança de cor para vermelho e pela precipitação dos sais biliares nas zonas circundantes das colónias características. Todas as Enterobactérias são detectadas, desde que degradem a glucose a ácido. Este meio de cultura não é, contudo, específico unicamente para estes organismos, de modo que outra flora acompanhante, tal como as *Aeromonas* podem evidenciar estas reacções neste meio.



Composição típica (g/L):

Reagente	Quantidade (g)
Peptona de carne	7.0
Extracto de levedura	3.0
Cloreto de sódio	5.0
D(+)-Glucose	10.0
Mistura de sais biliares	1.5
Vermelho neutro	0.03
Violeta de cristal	0.002
Agar-agar	13.0

Preparação (Meio desidratado)

1. Dissolver 39.5 g em 950 mL de água destilada, previamente autoclavada.

Rose-Bengal Chloramphenicol Agar (RBC Agar)

Agar selectivo para a contagem de bolores e leveduras em géneros alimentícios. O pH neutro combinado com o chloramphenicol inibe o crescimento da maioria das bactérias.



Composição típica (g/L):

Reagente	Quantidade (g)
Peptona micológica	5.0
Glucose	10.0
Dihidrogeno fosfato de potássio	1.0
Sulfato de magénio	0.5
Rose Bengal	0.05
Chloramphenicol	0.1
Agar-agar	15.5

Preparação (Meio desidratado)

1. Dissolver 32.2 g em 1000mL de água destilada;
2. Esterilizar no autoclave a 121°C durante 15 minutos;
3. Arrefecer até cerca de 50°C, e colocar em placas até solidificar.
4. Aparência do meio é turva de cor rosa/vermelho.

Harrigan, W.F.. *Laboratory Methods in Food Microbiology*. **1998**. 3rd edition, Academic Press.

Manual de Microbiologia, Merck, Alemanha.

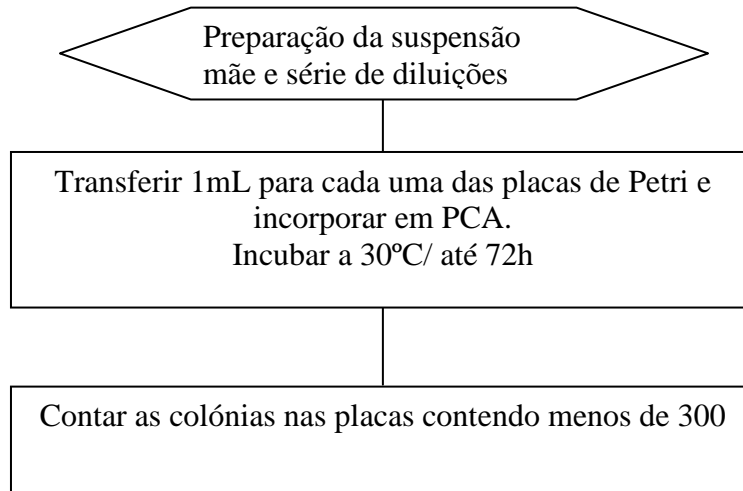
http://pt.vwr.com/app/Header?tmpl=/gama_de_produtos/microbiologia/intro_microbio.htm

Anexo IV

Procedimentos experimentais seguidos para as análises microbiológicas

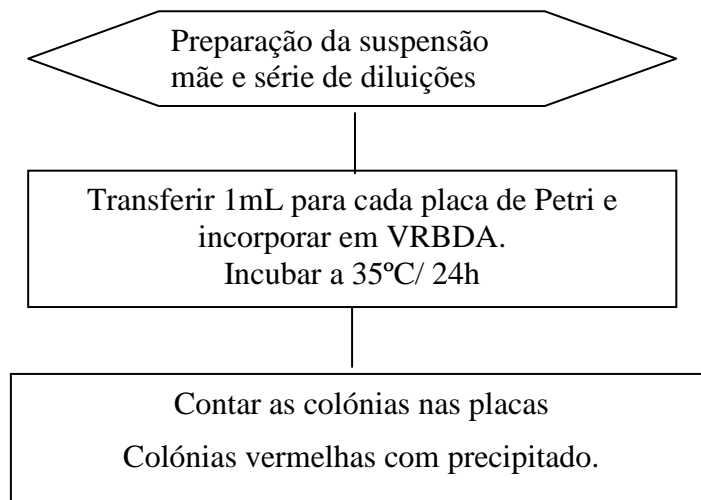
Contagem de microrganismos totais mesófilos

Esquema de trabalho:



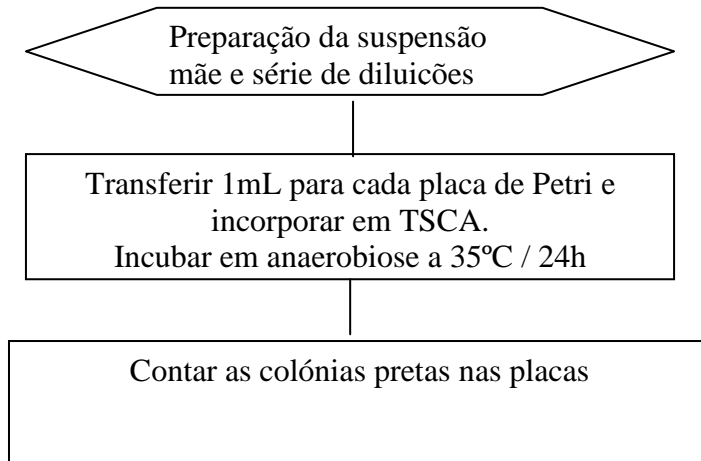
Contagem de *Enterobacteriaceae*

Esquema de trabalho:



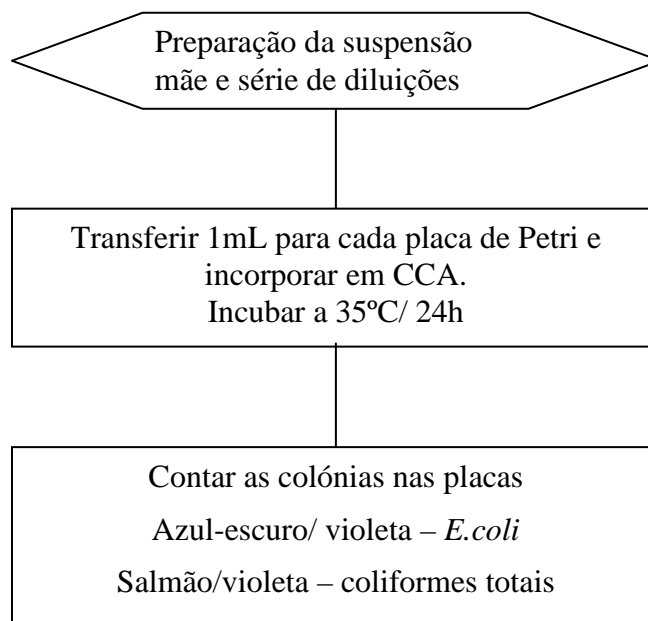
Contagem de *Clostridium*

Esquema de trabalho:



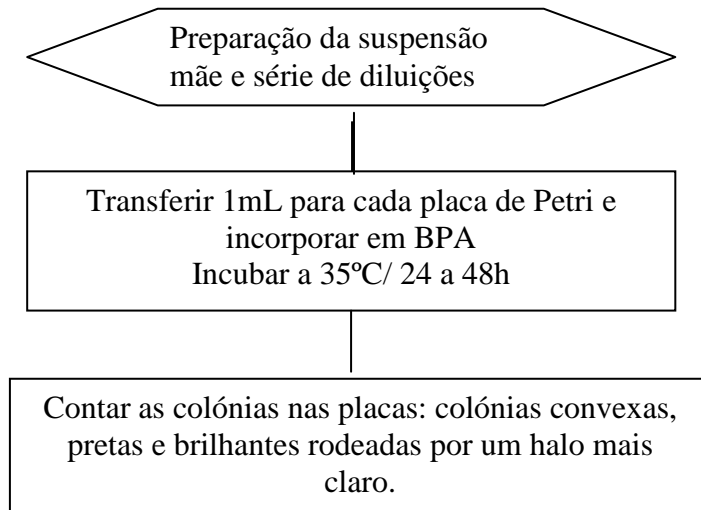
Contagem de coliformes e *E.coli*

Esquema de trabalho:



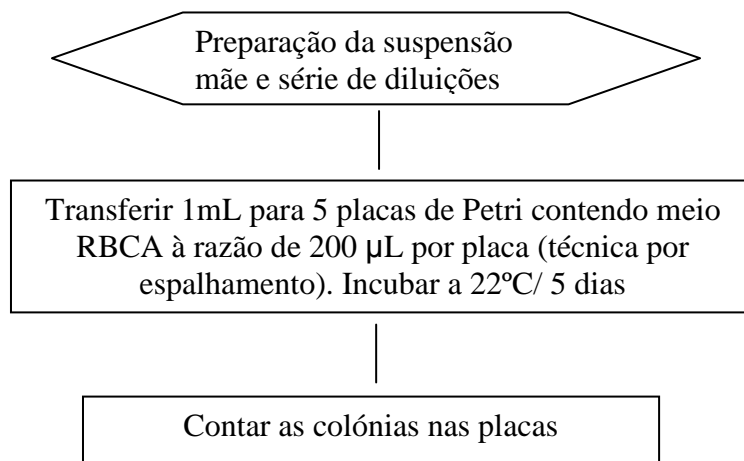
Staphylococcus aureus

Esquema de trabalho:



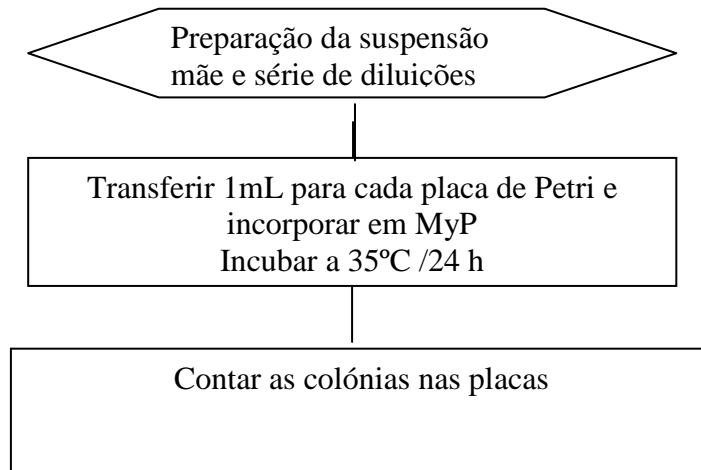
Bolores e leveduras

Esquema de trabalho:



Bacillus cereus

Esquema de trabalho:



Anexo V

**Respostas obtidas pelo programa DMFit – ComBase relativas à aplicação dos
resultados experimentais**

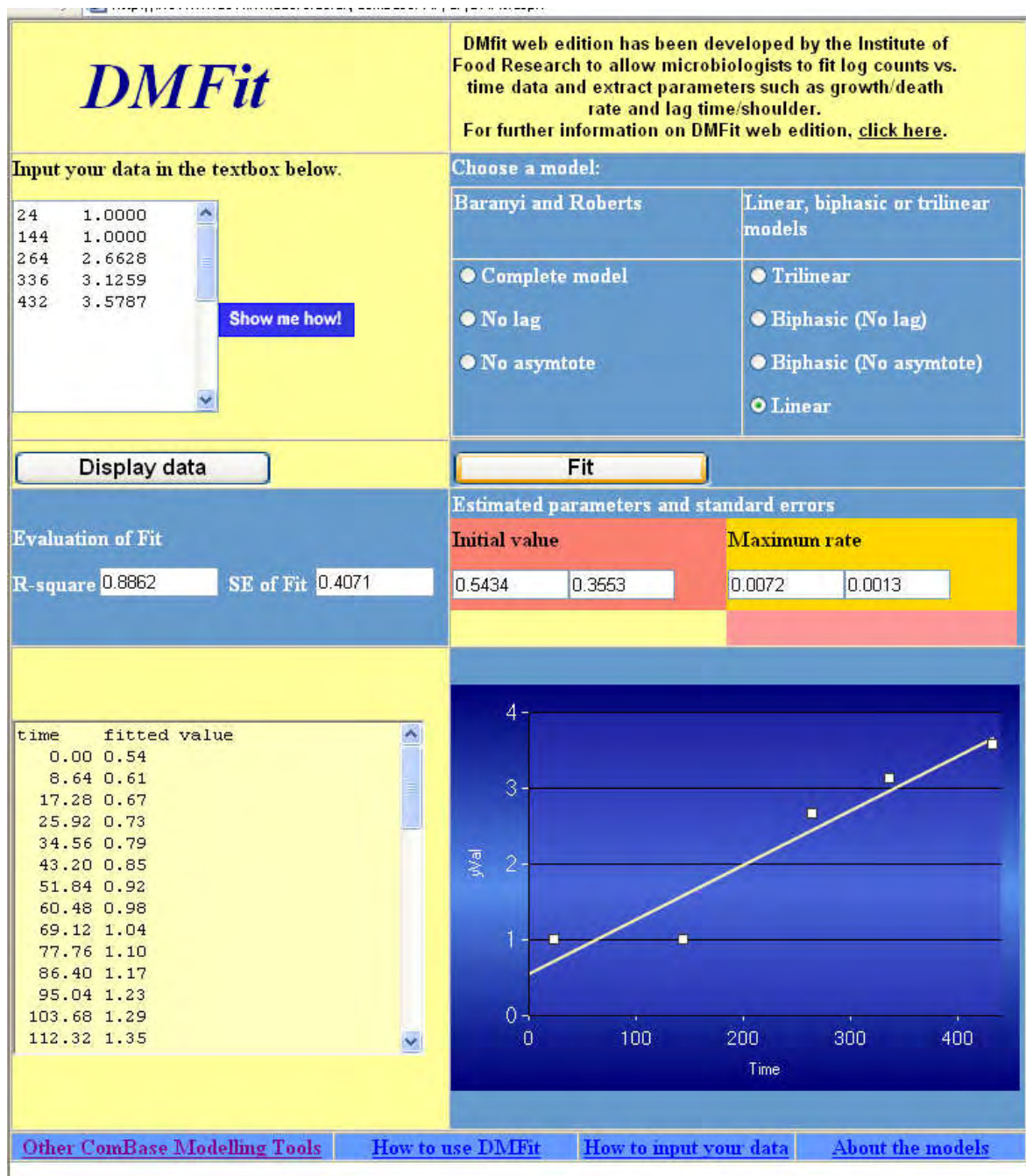


Figura v(1). Resposta da aplicação do DMFit aos resultados experimentais do arroz com 65 minutos de espera entre o fim da cocção e o doseamento das cuvets, da 2ª amostragem, aplicando o modelo Linear.

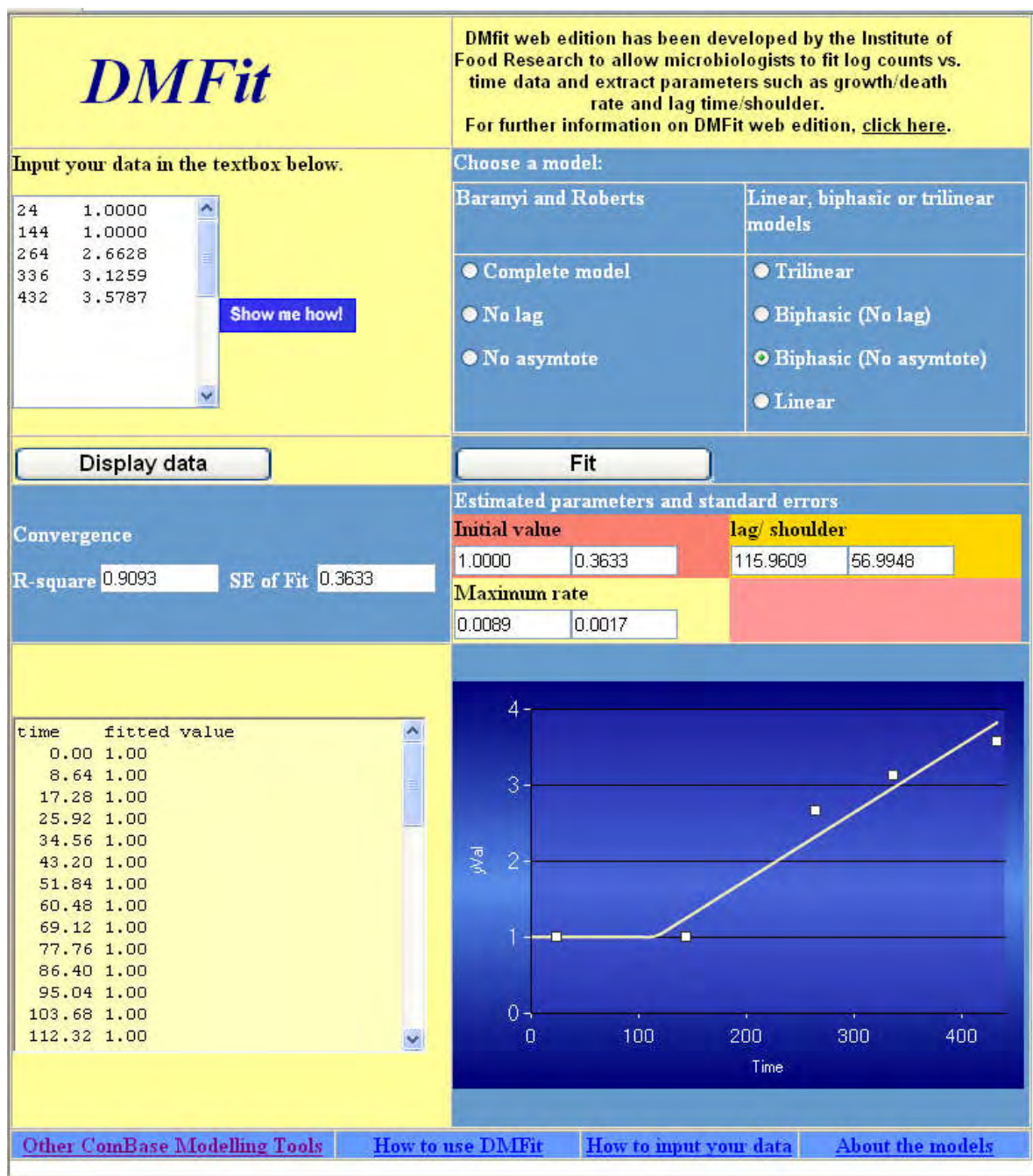


Figura v(2).Resposta da aplicação do DMFit aos resultados experimentais do arroz com 65 minutos de espera entre o fim da cocção e o doseamento das cuvets, da 2ª amostragem, aplicando o modelo Bifásico sem considerar a fase estacionária.

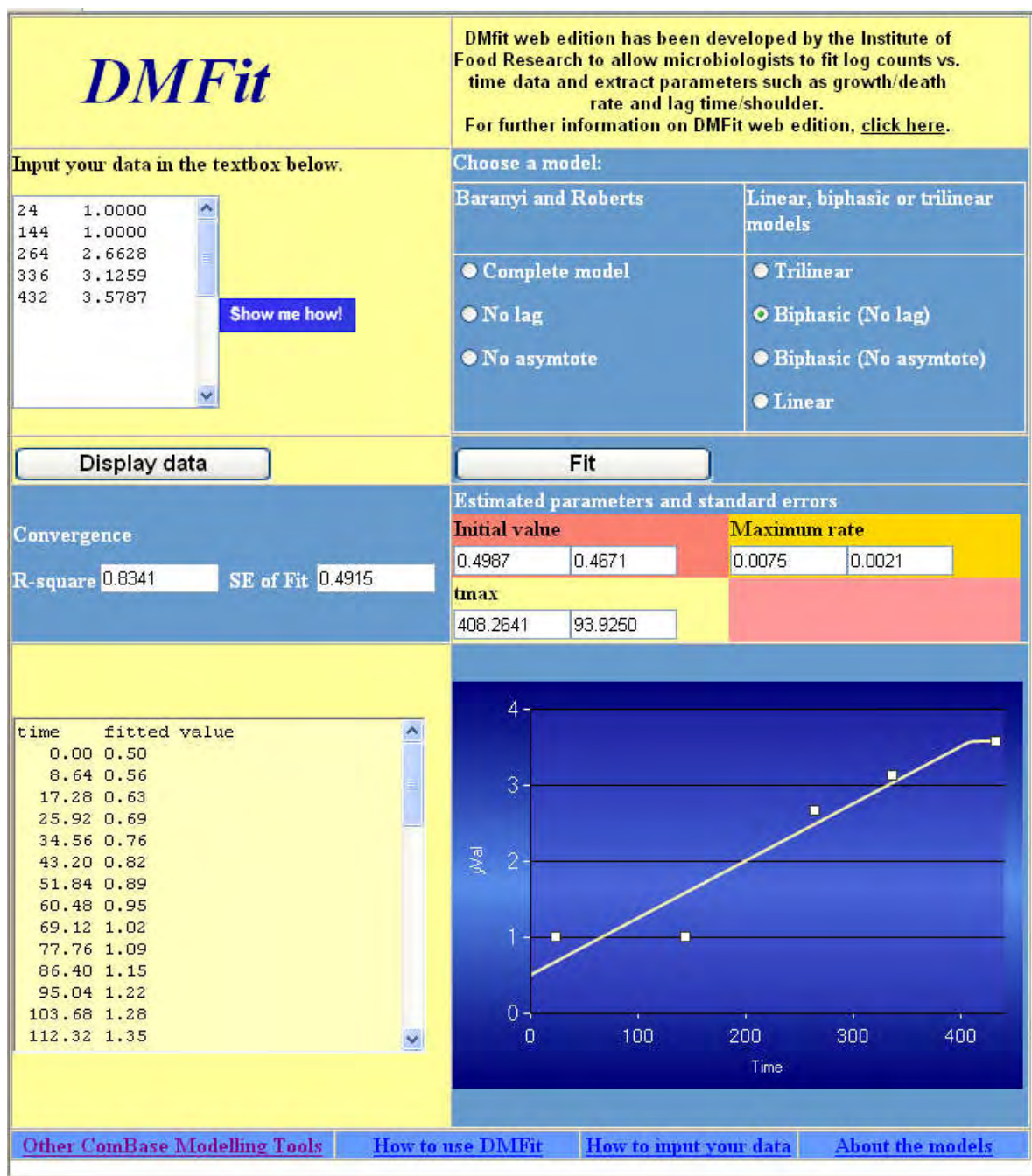


Figura v(3). Resposta da aplicação do DMFit aos resultados experimentais do arroz com 65 minutos de espera entre o fim da cocção e o doseamento das cuvets, da 2ª amostragem, aplicando o modelo Bifásico sem considerar a fase lag.

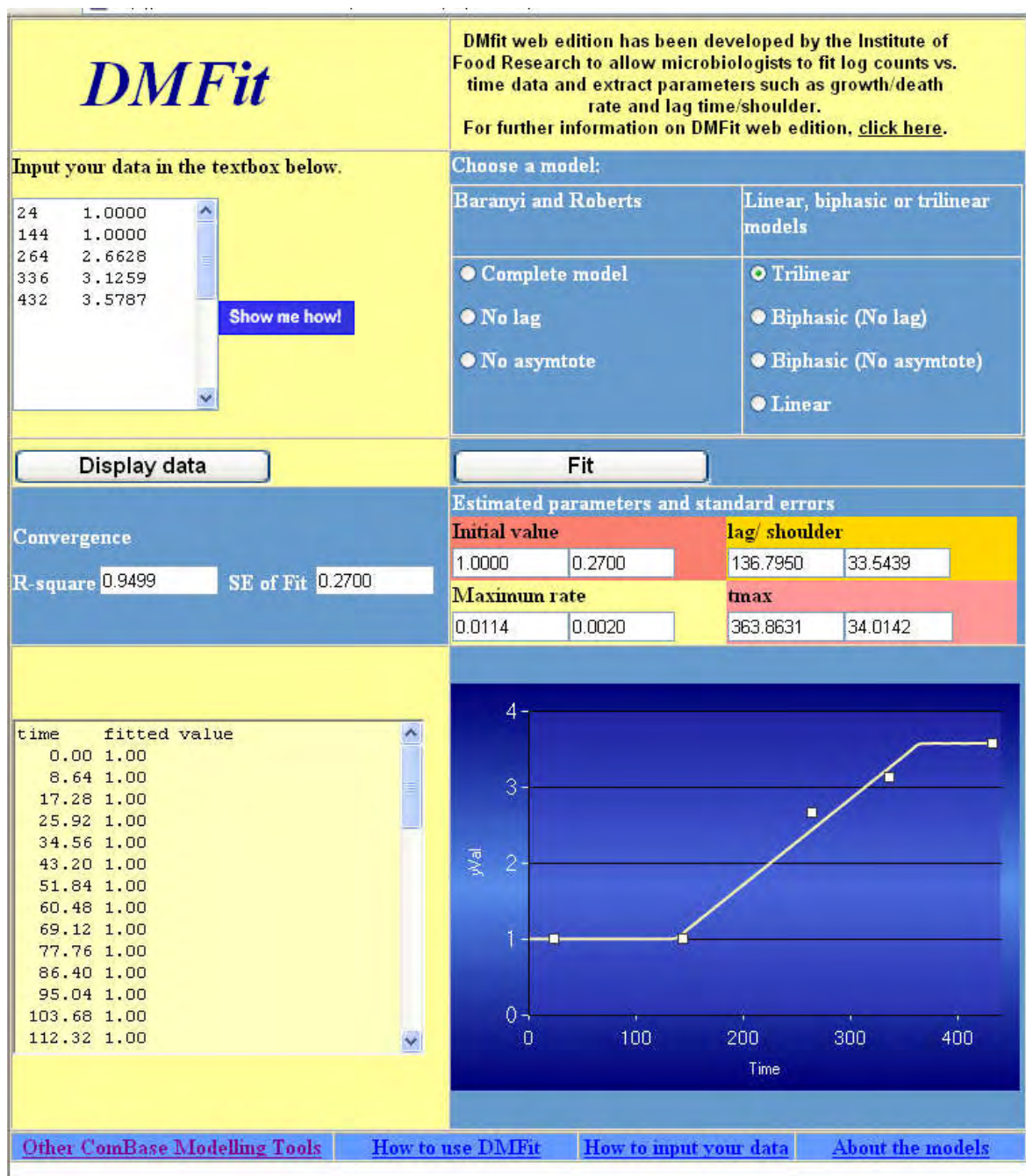


Figura v(4). Resposta da aplicação do DMFit aos resultados experimentais do arroz com 65 minutos de espera entre o fim da cocção e o doseamento das cuvetes, da 2ª amostragem, aplicando o modelo Tri-linear.

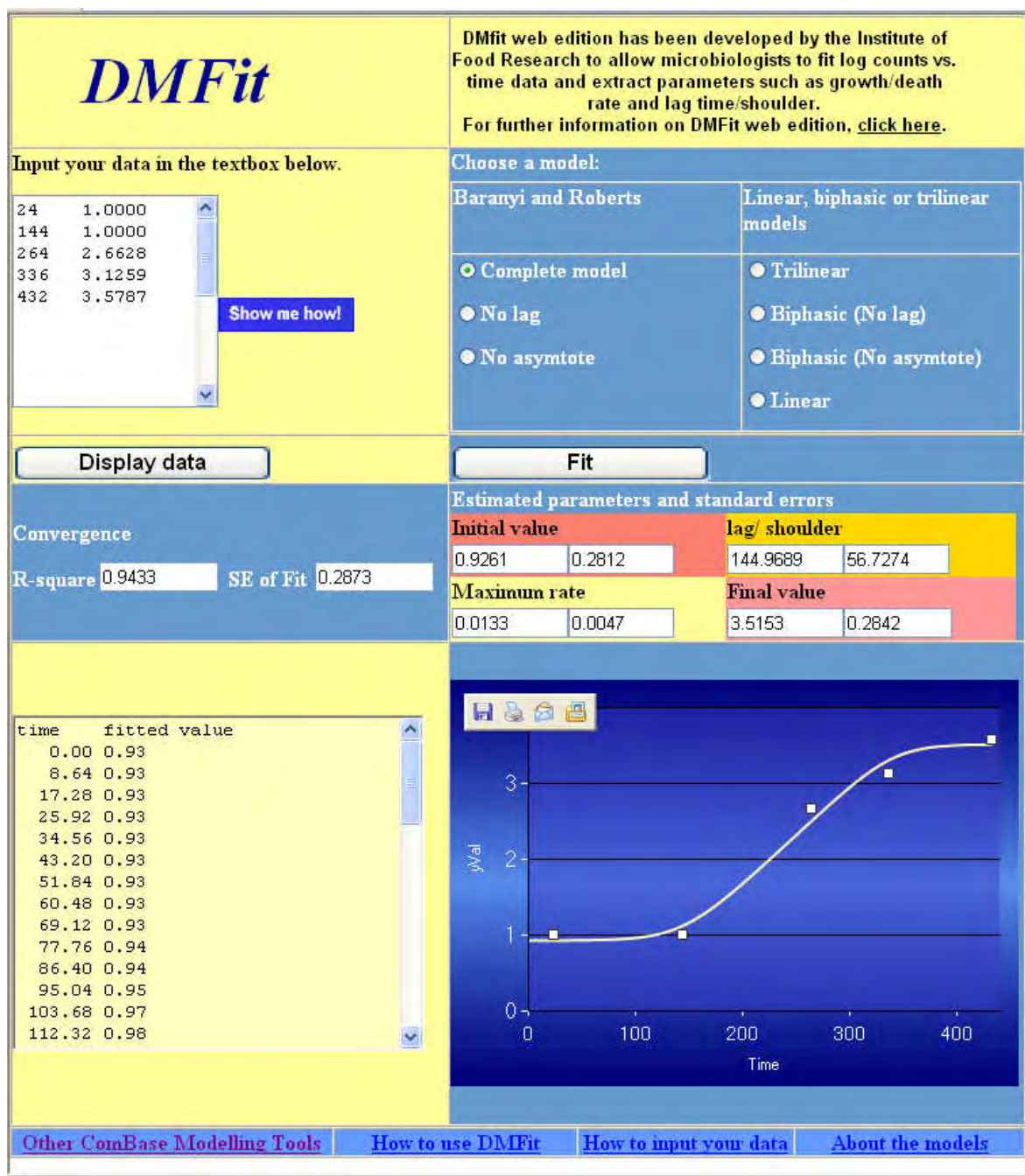


Figura v(5). Resposta da aplicação do DMFit aos resultados experimentais do arroz com 65 minutos de espera entre o fim da cocção e o doseamento das cuvets, da 2ª amostragem, aplicando o modelo completo de Baranyi e Roberts.

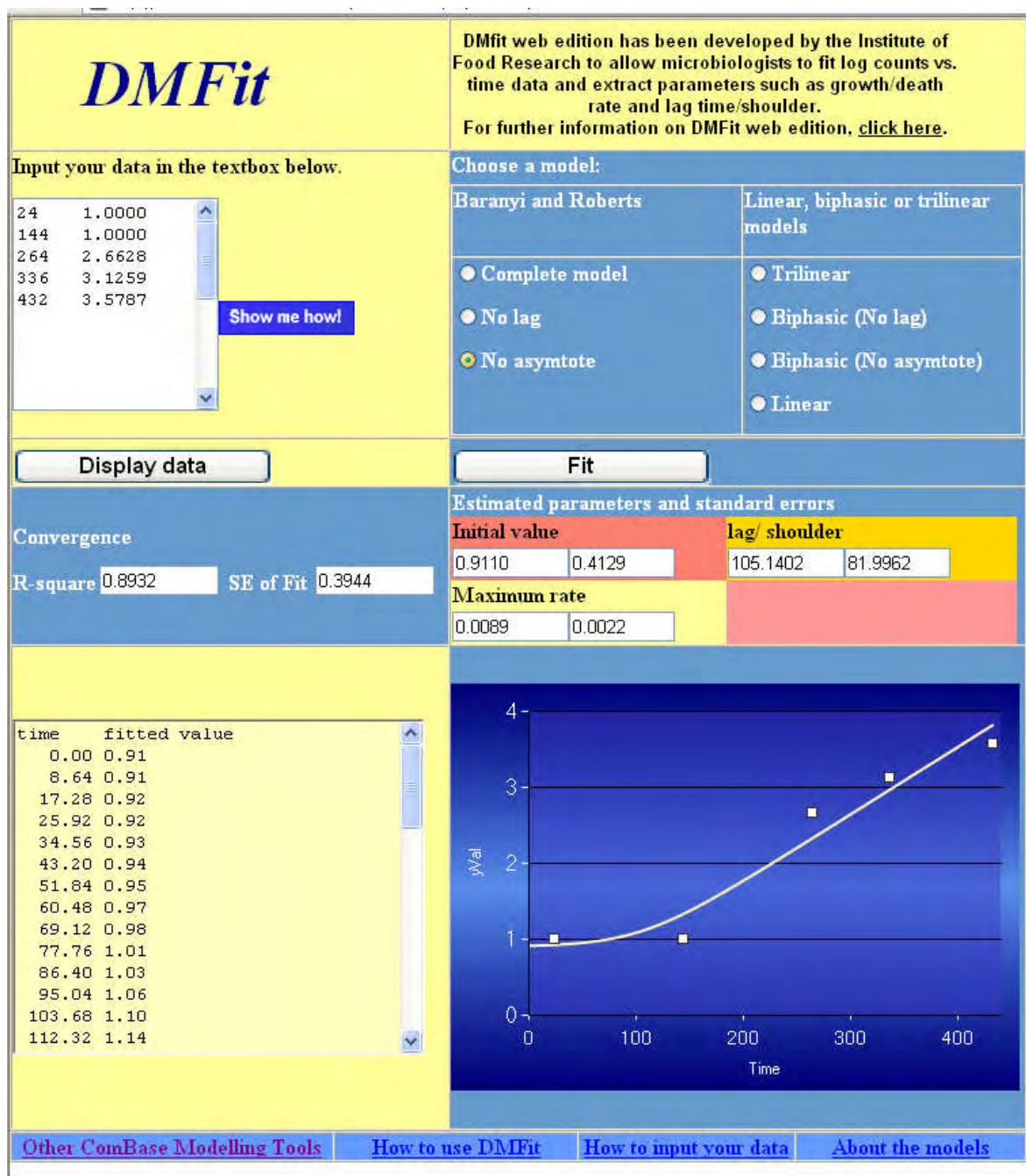


Figura v(6). Resposta da aplicação do DMFit aos resultados experimentais do arroz com 65 minutos de espera entre o fim da cocção e o doseamento das cuvets, da 2ª amostragem, aplicando o modelo de Baranyi e Roberts sem considerar a fase estacionária.

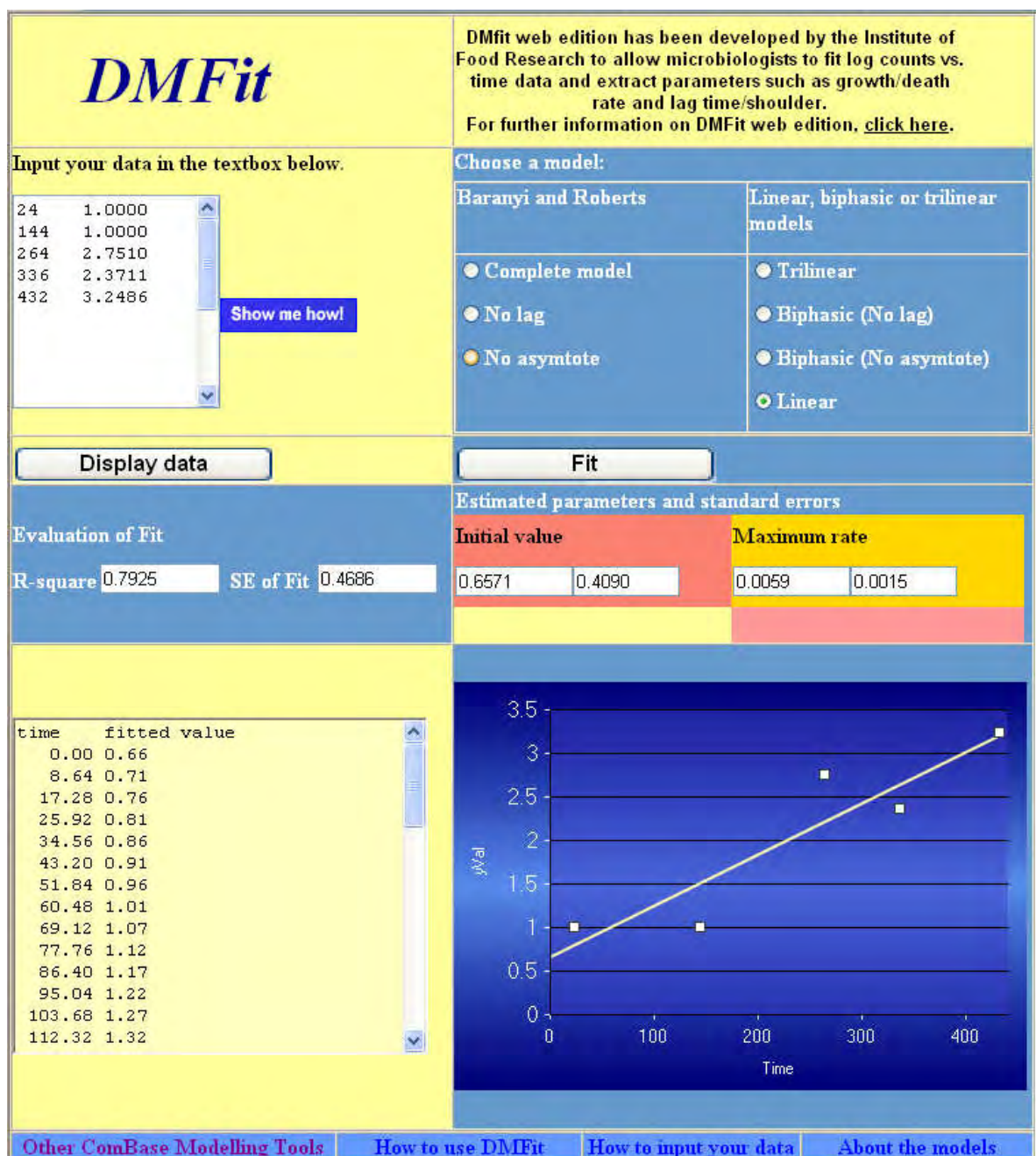


Figura v(7). Resposta da aplicação do DMFit aos resultados experimentais do arroz com 80 minutos de espera entre o fim da cocção e o doseamento das cuvetes, da 2ª amostragem, aplicando o modelo Linear.

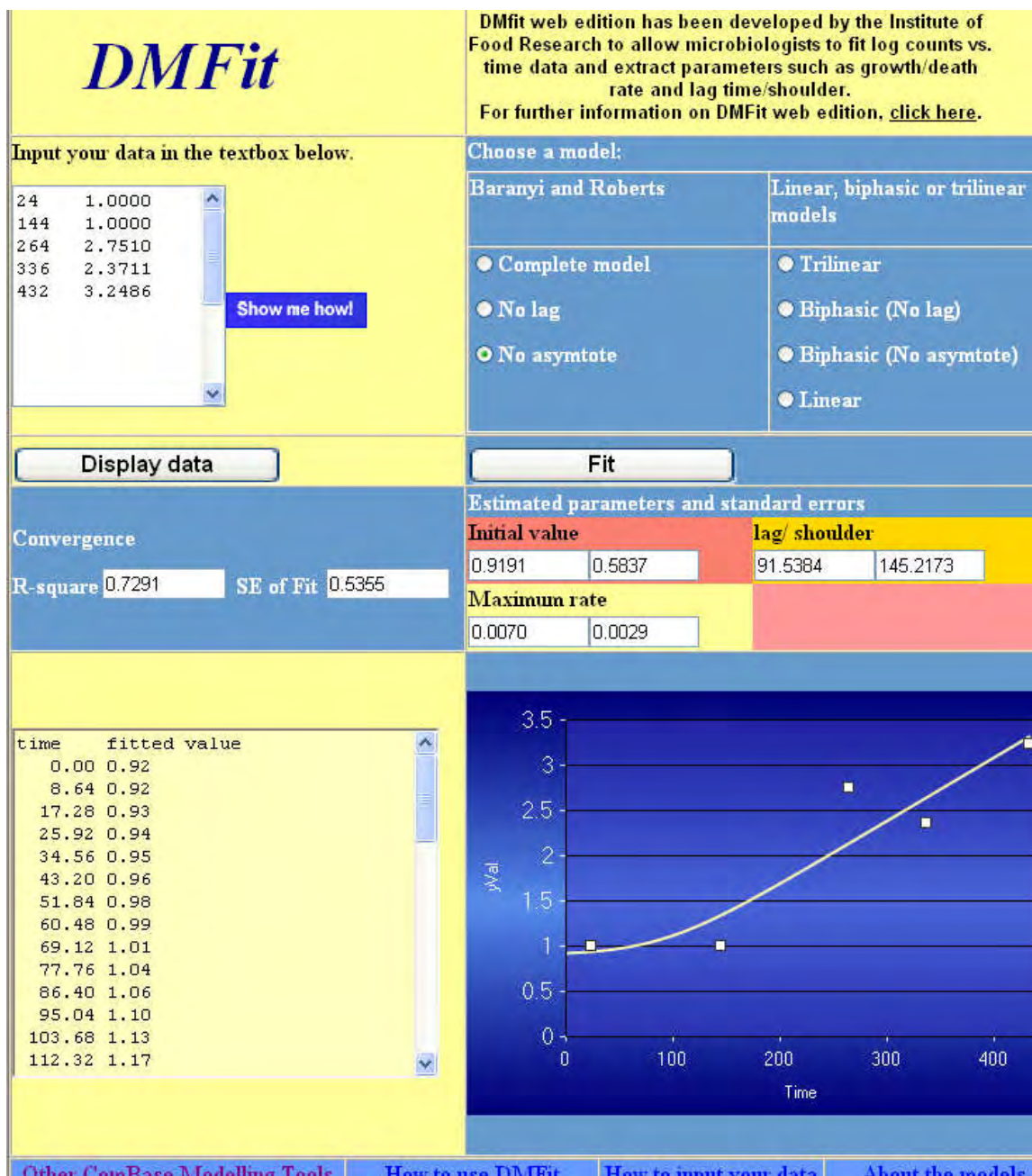


Figura v(8). Resposta da aplicação do DMFit aos resultados experimentais do arroz com 80 minutos de espera entre o fim da cocção e o doseamento das cuvets, da 2ª amostragem, aplicando o modelo de Baranyi e Roberts sem considerar a fase estacionária.

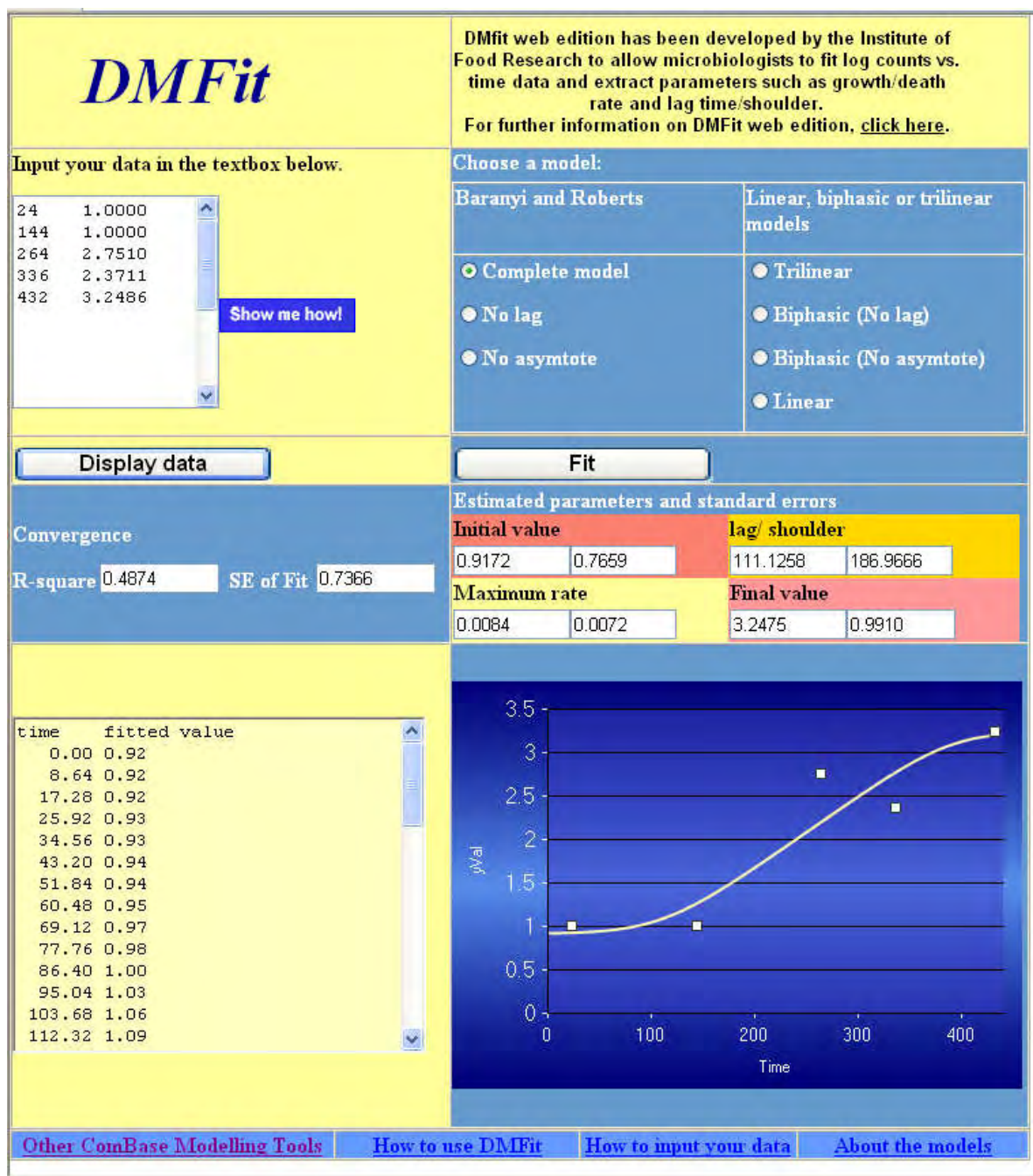


Figura v(9). Resposta da aplicação do DMFit aos resultados experimentais do arroz com 80 minutos de espera entre o fim da cocção e o doseamento das cuvetes, da 2ª amostragem, aplicando o modelo completo de Baranyi e Roberts.

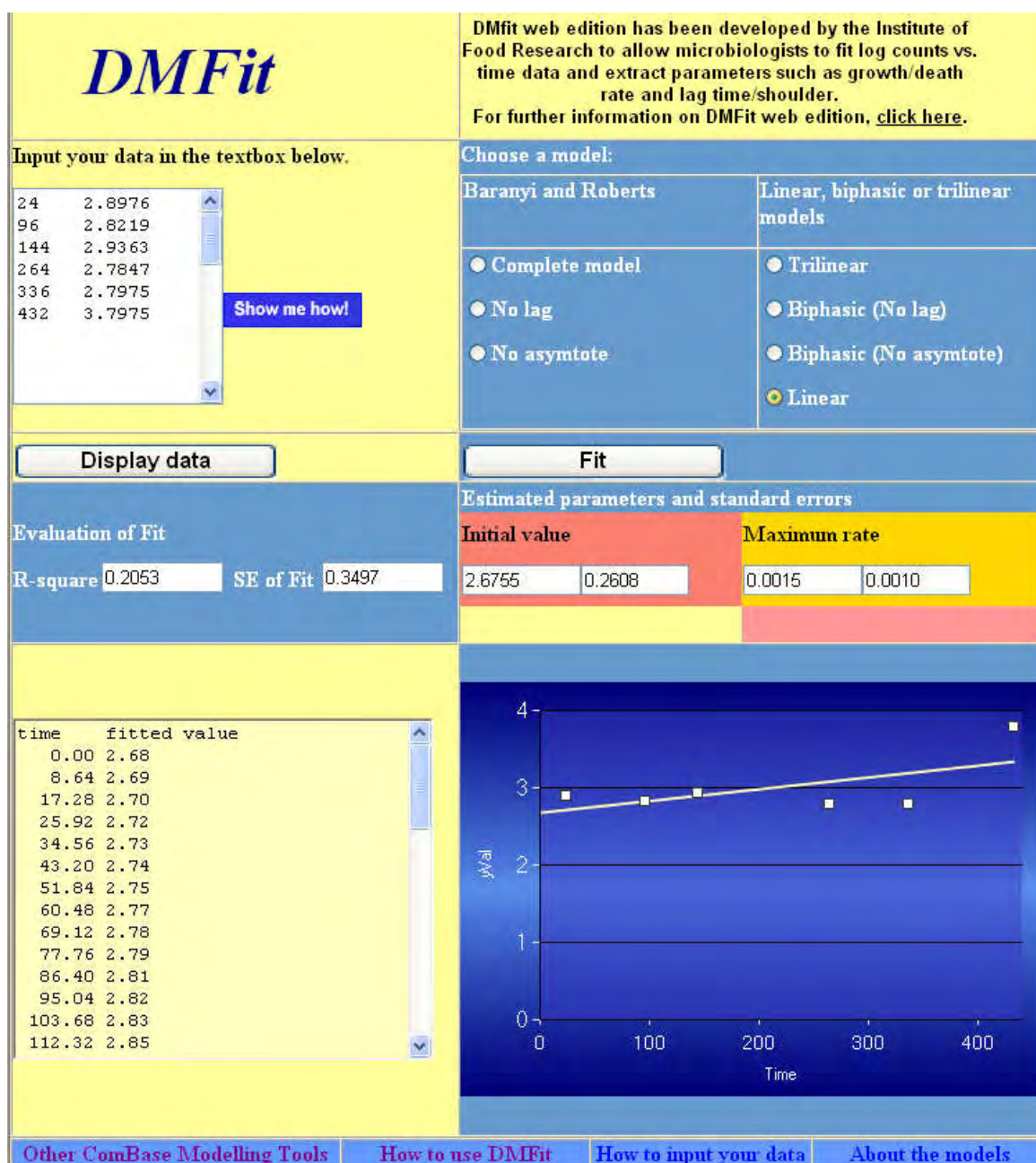


Figura v(10). Resposta da aplicação do DMFit aos resultados experimentais do chili com 30 minutos de espera entre o fim da cocção e o doseamento das cuvetes, da 2ª amostragem, aplicando o modelo Linear.

Anexo VI

**Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a
comer preparados em estabelecimentos de restauração**

Tabela VI (1) - Grupos de alimentos prontos a comer.

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Refeições/Sandes/Bolos/ Sobremesas doces com ingredientes totalmente cozinhados, ou adicionados de especiarias, ervas aromáticas secas, desidratadas ou tratadas por radiação ionizante, de produtos UHT e de maionese industrializada. Exemplos: Feijoada Pizza Bacalhau à Brás com salsa previamente processada Salada de batata com maionese industrial Pastéis de bacalhau/Croquetes/Rissóis Sandes de carne assada Sandes de <i>pâté</i> de atum (maionese industrial) Omeleta de Queijo /fiambre <i>Mousse</i> de chocolate instantânea Bolo de chocolate Arroz doce com ou sem canela Gelatinas Salada de fruta/fruta laminada em calda	Refeições/Sandes/Bolos/ Sobremesas doces cozinhadas adicionadas de ingredientes crus e/ou com flora específica própria Exemplos: Salada de batata com tomate/alface Salada de feijão frade com atum, salsa e cebola picada ou molho vinagrete Prato de peixe/carne/ovos adicionado de salada de vegetais ou frutos Bacalhau à Brás c/ salsa crua e/ou azeitonas Sandes com carne assada e alface Sandes de fiambre, queijo ou enchidos <i>Mousse</i> de chocolate Pudins com fruta ao natural Salada de fruta em calda adicionada de fruta ao natural	Saladas/ Vegetais/Frutos crus Alface Exemplos: Tomate Cenoura Couve roxa Salada de frutas Fruta ao natural laminada Morangos

Os termos usados para expressar a qualidade microbiológica nos alimentos cozinhados prontos a comer são:

Satisfatório - os resultados analíticos indicam uma boa qualidade microbiológica.

Aceitável - os resultados analíticos indicam que o produto se encontra dentro dos limites estabelecidos.

Não satisfatório - os resultados analíticos indicam que o produto não satisfaz um ou mais dos valores estabelecidos.

Inaceitável/potencialmente perigoso - Os resultados analíticos indicam a presença de microrganismos patogénicos ou toxinas que poderão constituir um risco para a saúde. Este resultado deve ser comunicado imediatamente à unidade onde foi detectado, para que sejam tomadas as medidas que permitam corrigir a situação.

Tabela VI (2) - Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos cozinhados prontos a comer.

Microrganismo	Grupo de alimentos	Qualidade Microbiológica (ufc/g quando não indicado)			
		Satisfatório	Aceitável	Não satisfatório	Inaceitável /potencialmente perigoso
Microrganismos a 30°C	1	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^4$	$>10^4$	NA
	2	$\leq 10^3$	$>10^3 \leq 10^5$	$>10^5$	NA
	3	$\leq 10^4$	$>10^4 \leq 10^6$	$>10^6$	NA
Leveduras	1*	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^4$	$>10^4$	NA
	2	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^4$	$>10^5$	NA
	3	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^5$	$>10^5$	NA
Bolores	1*	≤ 10	$>10 \leq 10^2$	$>10^2$	#
	2	≤ 10	$>10 \leq 10^2$	$>10^2$	#
	3	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^3$	$>10^3$	#
Coliformes totais	1	≤ 10	$>10 \leq 10^2$	$>10^2$	NA
	2	≤ 10	$>10 \leq 10^3$	$>10^3$	NA
	3	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^4$	$>10^4$	NA
<i>E. coli</i>	1	≤ 10	NA	≥ 10	NA
	2	≤ 10	NA	≥ 10	NA
	3	≤ 10	$>10 \leq 10^3$	$\geq 10^2$	NA
<i>Listeria spp.</i>	1	$<10^2$	NA	$\geq 10^2$	NA
	2	$<10^2$	NA	$\geq 10^2$	NA
	3	$<10^2$	NA	$\geq 10^2$	NA
Anaeróbios sulfito reductores	1	≤ 10	$>10 \leq 10^3$	$>10^3 < 10^4$	$\geq 10^4$ #
	2	≤ 10	$>10 \leq 10^2$	$>10^3 < 10^4$	$\geq 10^4$ #
	3	≤ 10	$>10 \leq 10^2$	$>10^3 < 10^4$	$\geq 10^4$ #

Microrganismos Patogénicos

<i>Staphylococcus coagulase</i> positiva	1	$<10^2$	NA	$\geq 10^2 \leq 10^4$	$>10^4$
	2	$<10^2$	NA	$\geq 10^2 \leq 10^4$	$>10^4$
	3	$<10^2$	NA	$\geq 10^2 \leq 10^4$	$>10^4$
<i>Bacillus cereus</i>	1	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^3$	$>10^3 < 10^5$	$\geq 10^5$
	2	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^3$	$>10^3 < 10^5$	$\geq 10^5$
	3	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^3$	$>10^3 < 10^5$	$\geq 10^5$
<i>Clostridium perfringens</i>	1	<10	$\geq 10 \leq 10^3$	$>10^3 < 10^4$	$\geq 10^4$
	2	<10	$\geq 10 \leq 10^3$	$>10^3 < 10^4$	$\geq 10^4$
	3	<10	$\geq 10 \leq 10^3$	$>10^3 < 10^4$	$\geq 10^4$
<i>Salmonella</i> spp.	1	Ausente em 25g			Presente em 25g
	2	Ausente em 25g			Presente em 25g
	3	Ausente em 25g			Presente em 25g
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	Ausente em 25g	Presente em 25g $<10^2$ #	-----	$\geq 10^2$
	2	Ausente em 25g	Presente em 25g $<10^2$ #		$\geq 10^2$
	3	Ausente em 25g	Presente em 25g $<10^2$ #		$\geq 10^2$
<i>Campylobacter</i> spp.	1	Ausente em 25g			Presente em 25g
	2	Ausente em 25g			Presente em 25g
	3	Ausente em 25g			Presente em 25g
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	Ausente em 25g			Presente em 25g
	2	Ausente em 25g			Presente em 25g
	3	Ausente em 25g			Presente em 25g
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	Ausente em 25g			Presente em 25g
	2	Ausente em 25g			Presente em 25g
	3	Ausente em 25g			Presente em 25g

*- Aplicável em produtos conservados no frigorífico;

- Equacionado caso a caso;

NA - Não aplicável.

M. Isabel Santos¹, Cristina Correia¹, M. Isabel Campos Cunha², M. Margarida Saraiva²,
M. Rosário Novais¹

Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge - INSA; Centro de Segurança Alimentar e Nutrição - CSAN

¹Laboratório de Microbiologia dos Alimentos de Lisboa

²Laboratório de Microbiologia dos Alimentos do Porto

Tabela VI (3) - Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de pratos cozinhados.ⁱ


Parâmetro	Satisfatória	Aceitável	Não Satisfatória	Não aceitável
Contagens 30 °C	$<9 \times 10^5$	$9 \times 10^5 - 3 \times 10^6$	$>3 \times 10^6$	
Coliformes a 30 °C	$<3 \times 10^3$	$3 \times 10^3 - 1 \times 10^4$	$>1 \times 10^4$	
<i>E. coli</i>	$<3 \times 10^1$	$3 \times 10^1 - 1 \times 10^2$	$>1 \times 10^2$	
Estafilococos coag.+	$<3 \times 10^2$	$3 \times 10^2 - 1 \times 10^3$	$1 \times 10^3 - 5 \times 10^4$	$>10^5$
<i>Clostridium Sulf. red.</i>	negativo em 10^{-2}	negativo em 10^{-3}	positivo em 10^{-3}	
<i>Salmonella</i>	Ausente em 25 g			Presente em 25 g
<i>Listeria monocytogens</i>	Ausente em 25 g			Presente em 25 g

ⁱ Critérios baseados no Arrêté du 21 Décembre 1979.

Informação retirada de <http://qualfood.biostrument.com>, acedido a 26 de Novembro de 2009.

Anexo VII

Instruções de Trabalho para a Empresa Pascoal & Filhos S.A.

	IT₁		2009
	AValiação do efeito do tempo de espera, entre a Cocção e a selagem das CUVETES, NA CARGA MICROBIOLÓGICA DE REFEIÇÕES “COOK-CHILL”		Realizado por Marise de Oliveira
			Revisão 0

1. OBJECTIVO

Estas recomendações têm como objectivo estabelecer, de um modo geral, um procedimento possível para a avaliação do efeito do tempo de espera entre o término da cocção da refeição e o doseamento e selagem das cuvetes, na carga microbiológica das refeições preparadas pelo método “Cook-Chill”.

2. ÂMBITO

Aplica-se a refeições preparadas pelo método “Cook-Chill”.

3. REFERÊNCIAS

NP 1828 (1982) – Microbiologia Alimentar. Colheita de amostra para análise microbiológica. IPQ, Lisboa.

NP 1829 – Microbiologia Alimentar. Preparação de amostras para análise microbiológica. IPQ, Lisboa.

NP 2079 – Microbiologia Alimentar. Regras gerais para análise microbiológica. IPQ, Lisboa.

NP 3005 (1985) – Microbiologia Alimentar. Preparação das diluições para análise microbiológica. IPQ, Lisboa.


NP 1995 (1982) – Microbiologia Alimentar. Regras gerais para contagem de microrganismos a 30°C. IPQ, Lisboa.

NP 4137 (1991) – Microbiologia Alimentar. Regras gerais para determinação de *Enterobactereaceae* sem revitalização. Técnicas do número mais provável (NMP) e de contagem de colónias. IPQ, Lisboa.

NP 2164 – Microbiologia Alimentar. Regras gerais para a pesquisa de coliformes.

NP 2308 – Microbiologia Alimentar. Regras gerais para a pesquisa de *E. coli*.

NP 4396 (2002) – Microbiologia Alimentar. Regras gerais para contagem de *E. coli*. Método corrente. IPQ, Lisboa.

	IT₁		2009
	AValiação DO EFEITO DO TEMPO DE ESPERA, ENTRE A COCCÃO E A SELAGEM DAS CUVETES, NA CARGA MICROBIOLÓGICA DE REFEIÇÕES “COOK-CHILL”		Realizado por Marise de Oliveira
			Revisão 0

NP 4400 – Microbiologia Alimentar. Regras gerais para a contagem de *Saphylococcus aureus* (técnica com confirmação de colónias). IPQ, Lisboa.

NP 3277-1 – Contagem de bolores e leveduras a 25°C. IPQ, Lisboa.

NP 3441 – Carnes, derivados e produtos cárneos. Determinação do pH. Método de referência. IPQ, Lisboa.

Food Safety Authority of Ireland. 2005, Guidance Note No.18 – *Determination of Product Shelf- Life* Dublin, Ireland.

Food Safety Authority of Ireland. 2006, Guidance Note No.15 – *Cook-chill Systems in the food service sector* (Revision I). Dublin, Ireland.

4. DEFINIÇÃO DOS TERMOS

Cadeia “chill” – Cadeia contínua na produção do alimento, na qual é necessária a manutenção de determinada temperatura (chill temperature) por razões de segurança e qualidade.


“Chilling” – Rápida redução de temperatura, geralmente até uma temperatura específica.

Alimentos “Cook-Chill” – Produtos cozinhados que sofrem de seguida redução de temperatura, armazenados a temperaturas de refrigeração controladas (0 a 3°C), que devem ser reaquecidos imediatamente antes do seu consumo.

Embalamento – Qualquer operação que consista no colocar do alimento em embalagens (embalamento primário – embalagem em contacto directo com o alimento e embalagem secundário – alimento embalado é embalado novamente).

Alimento refrigerado – Alimento mantido a baixas temperaturas (acima do ponto de congelação) durante o armazenamento, afim de manter a segurança, qualidade e conformidade durante toda a sua vida útil.

Tempo de vida útil – Período durante o qual o alimento mantém a segurança microbiológica e todas as características sensoriais desejadas, quando armazenado a determinada temperatura. Este é

	IT₁		2009
	AValiação DO EFEITO DO TEMPO DE ESPERA, ENTRE A COCÇÃO E A SELAGEM DAS CUVETES, NA CARGA MICROBIOLÓGICA DE REFEIÇÕES “COOK-CHILL”		Realizado por Marise de Oliveira
			Revisão 0

determinado através da identificação dos perigos microbiológicos, aquecimento ou outro método de conservação a que foi submetido, material de embalagem e outros factores de inibição do crescimento microbiológico e de deterioração.

5. MATERIAL NECESSÁRIO

- 5.1 Tabuleiros;
- 5.2 Sacos para amostras (matérias-primas);
- 5.3 Cuvetes;
- 5.4 Doseadores para retirar manualmente as amostras, devidamente desinfectados;
- 5.5 Balança, sensível a 0.01g
- 5.6 Termómetro;
- 5.7 Cronómetro;
- 5.8 Armários de arrefecimento rápido.


6. FABRICO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

6.1 As refeições “Cook-Chill” para a amostragem devem ser preparadas em condições normais de processamento.

6.2 É importante tomar nota de qualquer facto relevante, ocorrido durante a preparação das matérias-primas usadas na produção da refeição ou durante a confecção desta última (ex.: avarias de equipamentos intervenientes, erros na preparação das matérias-primas, possíveis situações de contaminação das matérias-primas em espera ou durante a cocção da refeição, utensílios sem a devida higienização, não respeitar das regras de boas práticas de higiene por parte dos colaboradores). Ver IMLAB 1.

6.3 Deve proceder-se à medição da temperatura a que a preparação é submetida ao longo da cocção, afim de assegurar a detecção de possíveis desvios. Assegurar que a preparação atinge a temperatura de segurança (aconselhável que seja acima dos 90°C), antes de ser retirada para o doseamento. Ver IMLAB 2.

6.4 Aquando do término da cocção, deve retirar-se para um tabuleiro a quantidade necessária de produto, sendo que a referida quantidade diz respeito à soma da quantidade necessária para a totalidade das amostras. A massa a considerar para cada amostra deve ser igual à que existe na cuvette numa situação real de fabrico.

	IT₁		2009
	AValiação DO EFEITO DO TEMPO DE ESPERA, ENTRE A COCCÃO E A SELAGEM DAS CUVETES, NA CARGA MICROBIOLÓGICA DE REFEIÇÕES “COOK-CHILL”		Realizado por Marise de Oliveira
			Revisão 0

6.5 Para avaliar o efeito do tempo de espera sofrido pela refeição, na carga microbiológica desta, e o seu efeito na evolução desta mesma carga ao longo do tempo de vida útil da refeição em estudo, o conteúdo retirado para o tabuleiro vai ser submetido a tempos de espera diferentes.

6.5.1 Retiram-se as amostras para as cuvets consoante os tempos determinados e o número de cuvets desejado.

6.5.2 O número de cuvets total deve contemplar duas cuvets a mais que os dias que se pretende analisar em termos de tempo de conservação, sendo estas usadas para se efectuar as medições de temperatura.

6.5.3 Os tempos de espera a considerar devem ser definidos inequivocamente antes do início do estudo.

6.5.4 Devem medir-se as temperaturas nos referidos tempos, antes do doseamento (no tabuleiro).

6.5.5 Antes de dosear as cuvets o conteúdo dos tabuleiros deve ser convenientemente homogeneizado.

6.6 As amostras devem ser submetidas a redução de temperatura até 4°C de imediato.

6.7 Armazenar as amostras sob refrigeração a 4°C até que seja feita a análise microbiológica. Ver anexo 1.

7. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

7.1 PREPARAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA E REAGENTES


Ver ITLAB 03. 01

7.2 COLHEITA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Ver ITLAB 02.04

7.3 CONTAGEM DE MICRORGANISMOS TOTAIS A 30°C

Ver ITLAB 02.14

	IT₁		2009
	AValiação DO EFEITO DO TEMPO DE ESPERA, ENTRE A COCÇÃO E A SELAGEM DAS CUVETES, NA CARGA MICROBIOLÓGICA DE REFEIÇÕES “COOK-CHILL”		Realizado por Marise de Oliveira
			Revisão 0

7.4 CONTAGEM DE ENTEROBACTÉRIAS

Ver ITLAB 02.11

7.5 CONTAGEM DE COLIFORMES E *E.Coli* – CCA

Ver ITLAB 02.08

7.6 PESQUISA E CONTAGEM DE *Staphylococcus aureus*

Ver ITLAB 02.15 e ITLAB 02.16

7.7 CONTAGEM DE BOLORES E LEVEDURAS

Ver ITLAB 02.10

8. MEDIÇÃO DO pH E DA ACTIVIDADE DA ÁGUA


Efectuar em cada amostragem, a medição do pH e da actividade da água, tendo em conta a refeição em estudo, se esta for composta por partes a análise deve ser feita a cada uma das partes e à mistura. Devem fazer-se réplicas para assegurar a fiabilidade da medição.

No caso da medição da a_w , deve garantir-se que o tempo para fazer a leitura do valor é suficiente para estabilizar a medição no higrómetro usado.

9. RELATÓRIO

Este deve conter todas as informações referentes às amostras, assim como os dados relevantes em relação à amostragem (temperaturas de cocção, anomalias durante a preparação, possíveis factores de contaminação, etc).

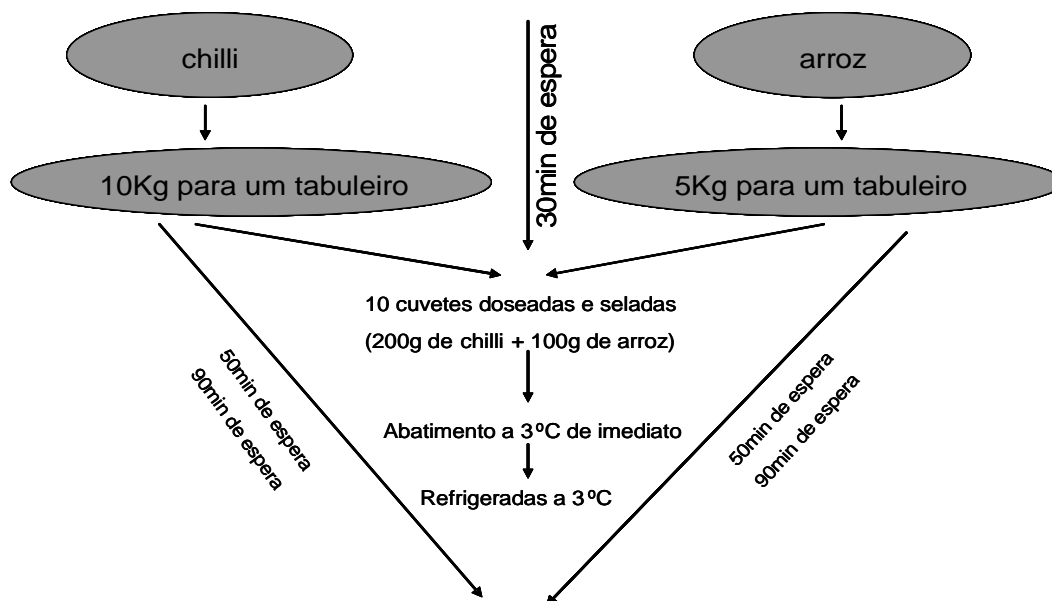
Os resultados (temperaturas, pH, a_w e carga microbiológica) devem ser apresentados em gráficos e/ou tabelas, de modo a facilitar a sua interpretação. Deve também apresentar-se nos relatórios, o delineamento relativo aos dias a efectuar as análises, para que se tenha uma visão alargada do estudo em questão e das extrapolações de resultados durante o estudo.

	IT₁		2009
	AValiação do efeito do tempo de espera, entre a cocção e a selagem das cUVetes, na carga microbiológica de refeições “Cook-Chill”		Realizado por Marise de Oliveira
			Revisão 0

Anexo 1

Exemplo:

Esquema do procedimento experimental seguido para a refeição de “Chili de Carne com Arroz Branco”.



Para cada tempo de espera foram doseadas 10 cUVetes, submetidas de imediato a redução rápida de temperatura até 3°C e armazenadas sob refrigeração a 3°C até ao momento de análise microbiológica

O tempo de espera considerado, é o tempo que o arroz e o chilli estão nos tabuleiros antes de serem doseados para as cUVetes.

Tabela 1. Exemplo do planeamento dos dias de análise às amostras.

Dias de análise	Dias de refrigeração	Chilli	Arroz
09.07.09	0		
10.07.09	1	✓	✓
13.07.09	4	✓	
15.07.09	6	✓	✓
20.07.09	11	✓	✓
23.07.09	14	✓	✓


	IT₁		2009
	AValiação do efeito do tempo de espera, entre a coocção e a selagem das cUVetes, na carga microbiológica de refeições “Cook-Chill”		Realizado por Marise de Oliveira
			Revisão 0

Tabela 2 – Resumo do procedimento.

Amostra a retirar	T= 0 min 10 cUVetes	T=20 min 10 cUVetes	T=40 min 10 cUVetes	T=60 min 10 cUVetes	T=90 min 10 cUVetes	Observações
10.0Kg de Chilli (200g x 10cUVetes x 5 dias)	200 g de chilli cada cUVete					Colocar 200g de chilli na cUVete e 100g de arroz e selar a cUVete, que deve sofrer abatimento rápido de imediato. Após o abatimento rápido, as cUVetes devem ser armazenadas em câmara fria até que seja feita a análise microbiológica. O chilli e o arroz colocado nas cUVetes tem tempos de espera diferentes desde que são preparados até serem doseados. Os tabuleiros com as “alíquotas” iniciais devem ser mantidos em espera na cozinha. Sempre que é retirada amostra para a cUVete, deve homogeneizar-se muito bem o conteúdo do tabuleiro.
5.0Kg de Arroz (100g x 10cUVetes x 5 dias)	100g de arroz cada cUVete					


	IT₁		2009
	ÁVALIAÇÃO DO EFEITO DO TEMPO DE ESPERA, ENTRE A COCÇÃO E A SELAGEM DAS CUVETES, NA CARGA MICROBIOLÓGICA DE REFEIÇÕES “COOK-CHILL”		Realizado por Marise de Oliveira
			Revisão 0

Tabela 3 – Lista de matérias-primas em estudo, diluições e meios usados na análise da refeição de Chilli de Carne com Arroz Branco.

Amostra	PCA (moo. totais)	CCA (coliformes e <i>E.coli</i>)	VRBDA (Enterobactérias)	BPA (<i>Staphylococcus aureus</i>)	RBCA (Bolors e leveduras)
Carne de vaca picada	2,3,4,5	1,2,3	1,2	1,2	
Pimento vermelho tiras cong.	2,3,4	1,2	1,2	1	
Cebola picada	2,3,4,5	1,2	1,2	1	1,2
Folhas de louro	2,3,4	1,2	1,2	1	1,2
Folhas tomilho	2,3,4	1,2	1,2	1	1,2
Cominhos	2,3,4,5	1,2	1,2	1	1,2

Tabela 4 – Lista de amostras em estudo (chilli), diluições e microrganismos a pesquisar.

Amostra	PCA (moo. totais)	CCA (coliformes e <i>E.coli</i>)	VRBDA (Enterobactérias)	BPA (<i>Staphylococcus aureus</i>)
T0	1,2,3	1	1	1
T20	1,2,3	1	1	1
T40	1,2,3	1	1	1
T60	1,2,3	1	1	1
T90	1,2,3	1	1	1



	IT₁		2009
	AValiação do efeito do tempo de espera, entre a coocção e a selagem das cUVetes, na carga microbiológica de refeições “Cook-Chill”		Realizado por Marise de Oliveira
			Revisão 0

Tabela 5 – Lista de amostras em estudo (arroz), diluições e microrganismos a pesquisar.

Amostra	PCA (moo. totais)	CCA (coliformes e <i>E.coli</i>)	VRBDA (Enterobactérias)	BPA (<i>Staphylococcus aureus</i>)	RBCA (Bolors e leveduras)
T0	1,2,3	1	1	1	1
T20	1,2,3	1	1	1	1
T40	1,2,3	1	1	1	1
T60	1,2,3	1	1	1	1
T90	1,2,3	1	1	1	1

	IT₂	2009
	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TEMPO DE ESPERA, ENTRE A SELAGEM DAS CUVETES E A REDUÇÃO RÁPIDA DE TEMPERATURA ATÉ 3°C, NA CARGA MICROBIOLÓGICA DE REFEIÇÕES “COOK-CHILL”	Realizado por Marise de Oliveira
		Revisão 0

1. OBJECTIVO

Estas recomendações têm como objectivo estabelecer, de um modo geral, um procedimento possível para a avaliação do efeito do tempo de espera entre a selagem das cuvetes e a redução rápida de temperatura das mesmas até 3°C, na carga microbiológica de refeições preparadas pelo método “Cook-Chill”.

2. ÂMBITO

Aplica-se a refeições preparadas pelo método “Cook-Chill”.

3. REFERÊNCIAS

NP 1828 (1982) – Microbiologia Alimentar. Colheita de amostra para análise microbiológica. IPQ, Lisboa.

NP 1829 – Microbiologia Alimentar. Preparação de amostras para análise microbiológica. IPQ, Lisboa.

NP 2079 – Microbiologia Alimentar. Regras gerais para análise microbiológica. IPQ, Lisboa.

NP 3005 (1985) – Microbiologia Alimentar. Preparação das diluições para análise microbiológica. IPQ, Lisboa.


NP 1995 (1982) – Microbiologia Alimentar. Regras gerais para contagem de microrganismos a 30°C. IPQ, Lisboa.

NP 4137 (1991) – Microbiologia Alimentar. Regras gerais para determinação de *Enterobacteriaceae* sem revitalização. Técnicas do número mais provável (NMP) e de contagem de colónias. IPQ, Lisboa.

NP 2164 – Microbiologia Alimentar. Regras gerais para a pesquisa de coliformes.

NP 2308 – Microbiologia Alimentar. Regras gerais para a pesquisa de *E. coli*.

NP 4396 (2002) – Microbiologia Alimentar. Regras gerais para contagem de *E. coli*. Método corrente. IPQ, Lisboa.

	IT₂	2009
	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TEMPO DE ESPERA, ENTRE A SELAGEM DAS CUVETES E A REDUÇÃO RÁPIDA DE TEMPERATURA ATÉ 3°C, NA CARGA MICROBIOLÓGICA DE REFEIÇÕES “COOK-CHILL”	Realizado por Marise de Oliveira
		Revisão 0

NP 4400 – Microbiologia Alimentar. Regras gerais para a contagem de *Saphylococcus aureus* (técnica com confirmação de colónias). IPQ, Lisboa.

NP 3277-1 – Contagem de bolores e leveduras a 25°C. IPQ, Lisboa.

NP 3441 – Carnes, derivados e produtos cárneos. Determinação do pH. Método de referência. IPQ, Lisboa.

Food Safety Authority of Ireland. 2005, Guidance Note No.18 – *Determination of Product Shelf- Life* Dublin, Ireland.

Food Safety Authority of Ireland. 2006, Guidance Note No.15 – *Cook-chill Systems in the food service sector* (Revision I). Dublin, Ireland.

4. DEFINIÇÃO DOS TERMOS


Cadeia “chill” – Cadeia contínua na produção do alimento, na qual é necessária a manutenção de determinada temperatura (chill temperature) por razões de segurança e qualidade.

“Chilling” – Rápida redução de temperatura, geralmente até uma temperatura específica.

Alimentos “Cook-Chill” – Produtos cozinhados que sofrem de seguida redução de temperatura, armazenados a temperaturas de refrigeração controladas (0 a 3°C), que devem ser reaquecidos imediatamente antes do seu consumo.

Embalamento – Qualquer operação que consista no colocar do alimento em embalagens (embalamento primário – embalagem em contacto directo com o alimento e embalamento secundário – alimento embalado é embalado novamente).

Alimento refrigerado – Alimento mantido a baixas temperaturas (acima do ponto de congelação) durante o armazenamento, afim de manter a segurança, qualidade e conformidade durante toda a sua vida útil.

	IT₂	2009
	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TEMPO DE ESPERA, ENTRE A SELAGEM DAS CUVETES E A REDUÇÃO RÁPIDA DE TEMPERATURA ATÉ 3°C, NA CARGA MICROBIOLÓGICA DE REFEIÇÕES “COOK-CHILL”	Realizado por Marise de Oliveira
		Revisão 0

Tempo de vida útil – Período durante o qual o alimento mantém a segurança microbiológica e todas as características sensoriais desejadas, quando armazenado a determinada temperatura. Este é determinado através da identificação dos perigos microbiológicos, aquecimento ou outro método de conservação a que foi submetido, material de embalagem e outros factores de inibição do crescimento microbiológico e de deterioração.

5. MATERIAL NECESSÁRIO

- 5.1 Termómetro;
- 5.2 Cronómetro;
- 5.3 Armários de arrefecimento rápido.

6. FABRICO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS


6.1 As refeições “Cook-Chill” para a amostragem devem ser preparadas em condições normais de processamento.

6.2 É importante tomar nota de qualquer facto relevante, ocorrido durante a preparação das matérias-primas usadas na produção da refeição ou durante a confecção desta última (ex.: avarias de equipamentos intervenientes, erros na preparação das matérias-primas, possíveis situações de contaminação das matérias-primas em espera ou durante a confecção da refeição, utensílios sem a devida desinfecção, não respeito das regras de boas práticas de higiene por parte dos colaboradores). Ver IMLAB 1.

6.3 Deve proceder-se à medição das temperaturas a que as preparações são submetidas ao longo da confecção, afim de assegurar a detecção de possíveis desvios. Assegurar que a preparação atinge a temperatura de segurança (aconselhável que seja acima dos 90°C), antes de ser retirada para o doseamento. Ver IMLAB 2.

6.4 Os tempos de espera a considerar devem ser definidos inequivocamente antes do início do estudo.

6.5 Retirar o número de cuvets total necessário para o estudo das primeiras cuvets a serem doseadas e seladas.

	IT₂	2009
	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TEMPO DE ESPERA, ENTRE A SELAGEM DAS CUVETES E A REDUÇÃO RÁPIDA DE TEMPERATURA ATÉ 3°C, NA CARGA MICROBIOLÓGICA DE REFEIÇÕES “COOK-CHILL”	Realizado por Marise de Oliveira
		Revisão 0

6.6 Registrar a temperatura da refeição ou dos constituintes da mesma, logo que são doseadas e seladas as cuvets, considerando esta temperatura como a correspondente ao tempo 0.

6.7 Submeter de imediato a redução rápida de temperatura, o primeiro conjunto de cuvets a considerar.

6.8 De acordo com os tempos pré-definidos, submeter a redução rápida de temperatura os restantes conjuntos de cuvets, registrando o binómio tempo/temperatura antes do referido abatimento.

6.9 Armazenar as amostras sob refrigeração a 3°C até que seja feita a análise microbiológica. Ver anexo 1.

7 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

7.1 COLHEITA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Ver ITLAB 02.04.

7.2 PREPARAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA E REAGENTES

Ver ITLAB 03.01.

7.3 CONTAGEM DE MICRORGANISMOS TOTAIS A 30°C

Ver ITLAB 02.14.

7.4 CONTAGEM DE ENTEROBACTÉRIAS

Ver ITLAB 02.11.

7.5 CONTAGEM DE COLIFORMES E *E.Coli* – CCA


Ver ITLAB 02.08.

7.6 PESQUISA E CONTAGEM DE *Staphylococcus aureus*

Ver ITLAB 02.15 e ITLAB 02.16.

7.7 CONTAGEM DE BOLORES E LEVEDURAS

Ver ITLAB 02.10.

	IT₂		2009
	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TEMPO DE ESPERA, ENTRE A SELAGEM DAS CUVETES E A REDUÇÃO RÁPIDA DE TEMPERATURA ATÉ 3°C, NA CARGA MICROBIOLÓGICA DE REFEIÇÕES “COOK-CHILL”		Realizado por Marise de Oliveira
			Revisão 0

8. MEDIÇÃO DO pH E DA ACTIVIDADE DA ÁGUA


Efectuar em cada amostragem, a medição do pH e da actividade da água, tendo em conta a refeição em estudo, se esta for composta por partes a análise deve ser feita a cada uma das partes e à mistura. Devem fazer-se réplicas para assegurar a fiabilidade da medição.

No caso da medição da a_w , deve garantir-se que o tempo para fazer a leitura do valor é suficiente para estabilizar a medição no higrómetro usado.

9. RELATÓRIO

Este deve conter todas as informações referentes às amostras, assim como os dados relevantes em relação à amostragem (temperaturas de cocção, anomalias durante a preparação, possíveis factores de contaminação, etc).

Os resultados (temperaturas, pH, a_w e carga microbiológica) devem ser apresentados em gráficos e/ou tabelas, de modo a facilitar a sua interpretação. Deve também apresentar-se nos relatórios, o delineamento relativo aos dias a efectuar as análises, para que se tenha uma visão alargada do estudo em questão e das extrapolações de resultados durante o estudo.

	IT₂	2009
	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TEMPO DE ESPERA, ENTRE A SELAGEM DAS CUVETES E A REDUÇÃO RÁPIDA DE TEMPERATURA ATÉ 3°C, NA CARGA MICROBIOLÓGICA DE REFEIÇÕES “COOK-CHILL”	Realizado por Marise de Oliveira
		Revisão 0

Anexo 1

Esquema do procedimento experimental seguido para a refeição de “Chili de Carne com Arroz Branco”.

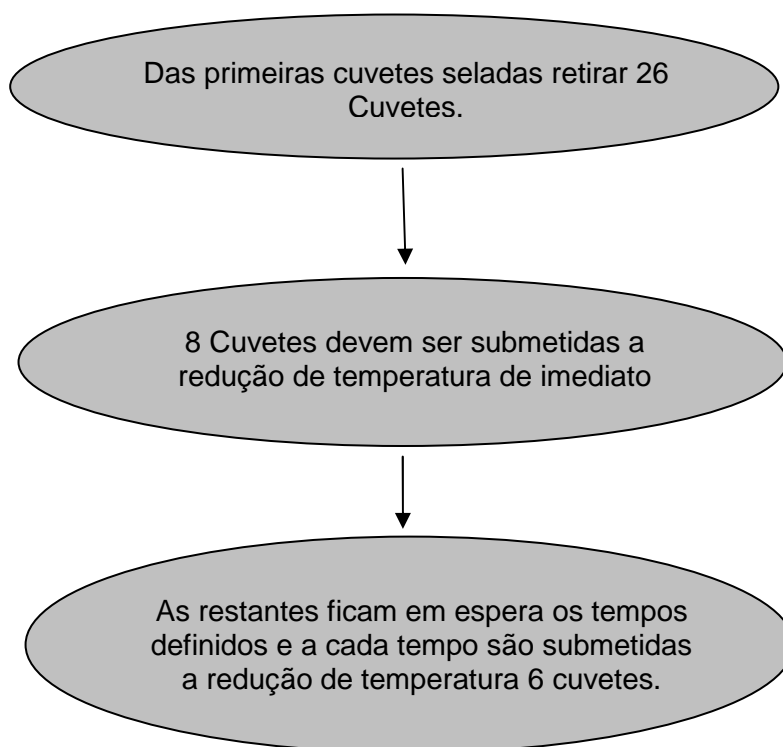




Tabela 1. Exemplo do planeamento dos dias de análise às amostras.

Dias de Análise	Dias de Refrigeração	Chilli	Arroz
28.09.09	0		
29.09.09	1	✓	✓
03.10.09	5	✓	✓
08.10.09	10	✓	✓
13.10.09	15	✓	✓
19.10.09	21	✓	✓

	IMLAB 1		2009
	Controlo da preparação de matérias-primas e da cocção de refeições preparadas pelo método “Cook-chill”		Realizado por Marise de Oliveira
			Revisão 0
			Registado por:

Data	
Refeição em estudo	

Matéria-prima/ Preparação	Etapa em que se detecta o problema	Descrição do problema

	IT₃		2009
	MICROBIOLOGIA PREDITIVA		Realizado por Marise de Oliveira
	APLICAÇÃO DE DADOS EXPERIMENTAIS DE CARGA MICROBIOLÓGICA - COMBASE		Revisão 0

1. OBJECTIVO

Estas recomendações têm como objectivo mostrar como inserir os dados experimentais relativos à evolução da carga microbiológica ao longo do tempo de refeições “Cook-chill”, no DMFit – ComBase.

2. ÂMBITO

Aplica-se a resultados experimentais de carga microbiológica obtidos ao longo do tempo, para quaisquer géneros alimentícios.

3. REFERÊNCIAS

Food Safety Authority of Ireland. 2005, Guidance Note No.18 – *Determination of Product Shelf- Life*. Dublin, Ireland.

Food Safety Authority of Ireland. 2006, Guidance Note No.15 – *Cook-chill Systems in the food service sector* (Revision I). Dublin, Ireland.

http://ifrsvwwwdev.ifrn.bbsrc.ac.uk/CombasePMP/GP/DMF_HelpC.aspx, acedido a 17 de Outubro de 2009.


Buchanan, R.L.; Whiting, R.C.; Damert, W.C.. *When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves*. 1997, Food Microbiology, 14: 313-326.

4. DEFINIÇÃO DOS TERMOS

Cadeia “chill” – Cadeia contínua na produção do alimento, na qual é necessária a manutenção de determinada temperatura (chill temperature) por razões de segurança e qualidade.

“Chilling” – Rápida redução de temperatura, geralmente até uma temperatura específica.

Alimentos “Cook-Chill” – Produtos cozinhados que sofrem de seguida redução de temperatura, armazenados a temperaturas de refrigeração controladas (0 a 3°C), que devem ser reaquecidos imediatamente antes do seu consumo.

	IT₃	2009
	MICROBIOLOGIA PREDITIVA	Realizado por Marise de Oliveira
	APLICAÇÃO DE DADOS EXPERIMENTAIS DE CARGA MICROBIOLÓGICA - COMBASE	Revisão 0

Alimento refrigerado – Alimento mantido a baixas temperaturas (acima do ponto de congelação) durante o armazenamento, afim de manter a segurança, qualidade e conformidade durante toda a sua vida útil.

Tempo de vida útil – Período durante o qual o alimento mantém a segurança microbiológica e todas as características sensoriais desejadas, quando armazenado a determinada temperatura. Este é determinado através da identificação dos perigos microbiológicos, aquecimento ou outro método de conservação a que foi submetido, material de embalagem e outros factores de inibição do crescimento microbiológico e de deterioração.

Género alimentício – Qualquer substância ou produto, transformado, parcialmente transformado ou não transformado, destinado a ser ingerido pelo ser. Este termo abrange bebidas, pastilhas elásticas e todas as substâncias, incluindo a água, intencionalmente incorporadas nos géneros alimentícios durante o seu fabrico, preparação ou tratamento. O termo não inclui: alimentos para animais; animais vivos, a menos que sejam preparados; estupefacientes ou substâncias psicotrópicas; medicamentos; produtos cosméticos; tabaco e produtos do tabaco; resíduos e contaminantes.

5. PROCEDIMNTO - COMO INTRODUIZIR OS RESULTADOS


5.1 Com os resultados experimentais obtidos, relativos à evolução da carga microbiológica ao longo do tempo procede-se à sua conversão em Log UFC/g e na conversão do tempo em horas;

5.2 Os números decimais devem ser representados por um ponto e não por vírgula;


5.3 Quando não se verificam contagens a sua representação deve ser feita por “-0.01”;

5.4 Existe um mínimo de 2 e um máximo de 100 binómios de contagem-tempo possíveis de introduzir no DMFit;

5.5 Após a introdução dos dados, escolhe-se um dos modelos que o programa disponibiliza e através do “Fit” obtém-se a representação dos dados introduzidos e os parâmetros estimados tendo em conta o modelo escolhido com os respectivos erros associados.

	IT₃		2009
	MICROBIOLOGIA PREDITIVA APLICAÇÃO DE DADOS EXPERIMENTAIS DE CARGA MICROBIOLÓGICA - COMBASE		Realizado por Marise de Oliveira
			Revisão 0

5.6 Caso o modelo escolhido não se adeque, ainda que com erros elevados, aos dados introduzidos, o programa dá como resposta uma mensagem de erro “*Data not consistent with model selected*”.



DMfit web edition has been developed by the Institute of Food Research to allow microbiologists to fit log counts vs. time data and extract parameters such as growth/death rate and lag time/shoulder.
For further information on DMFit web edition, [click here](#).

Input your data in the textbox below.

24	1.0000
144	1.0000
264	2.6628
336	3.1259
432	3.5787

Show me how!

Choose a model:

Baranyi and Roberts	Linear, biphasic or trilinear models
<input checked="" type="radio"/> Complete model	<input type="radio"/> Trilinear
<input type="radio"/> No lag	<input type="radio"/> Biphasic (No lag)
<input type="radio"/> No asymptote	<input type="radio"/> Biphasic (No asymptote)
	<input type="radio"/> Linear

Display data

Fit

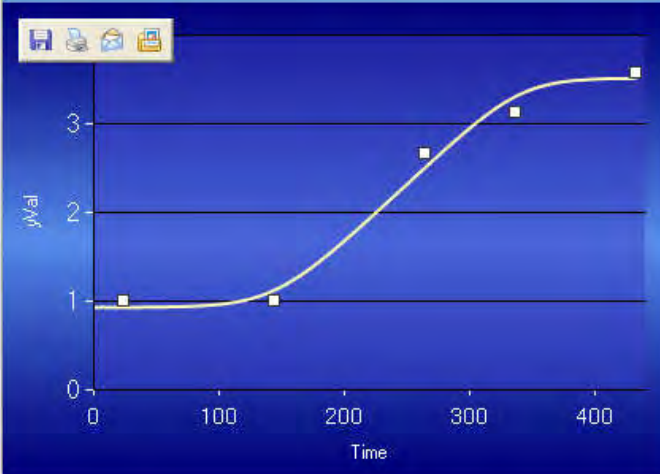
Convergence

R-square 0.9433 SE of Fit 0.2873


Estimated parameters and standard errors

Initial value		lag/ shoulder	
0.9261	0.2812	144.9689	56.7274
Maximum rate		Final value	
0.0133	0.0047	3.5153	0.2842

time	fitted value
0.00	0.93
8.64	0.93
17.28	0.93
25.92	0.93
34.56	0.93
43.20	0.93
51.84	0.93
60.48	0.93
69.12	0.93
77.76	0.94
86.40	0.94
95.04	0.95
103.68	0.97
112.32	0.98



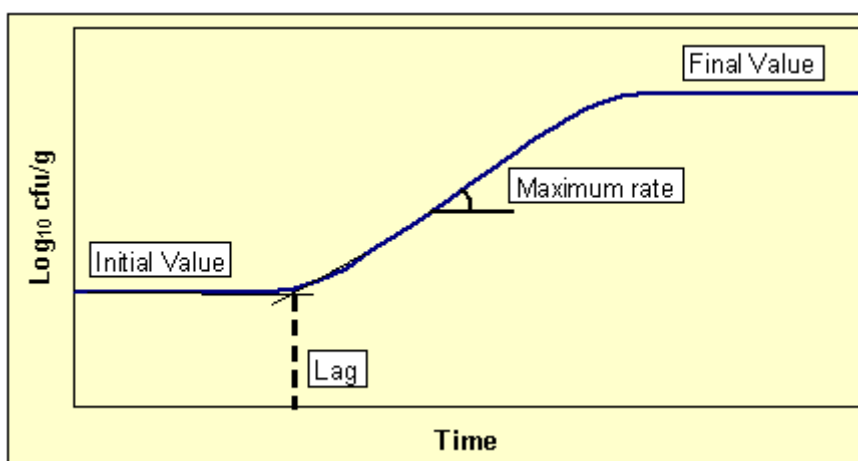
Other ComBase Modelling Tools How to use DMFit How to input your data About the models

	IT₃		2009
	MICROBIOLOGIA PREDITIVA		Realizado por Marise de Oliveira
	APLICAÇÃO DE DADOS EXPERIMENTAIS DE CARGA MICROBIOLÓGICA - COMBASE		Revisão 0

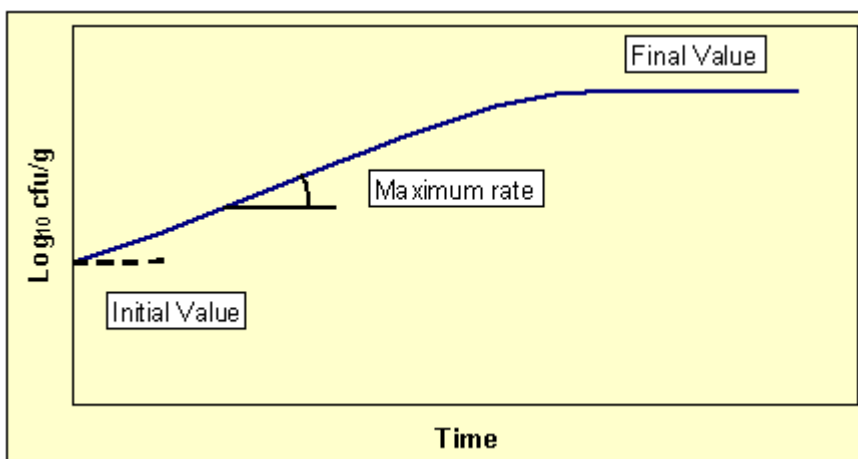
Anexo - Modelos possíveis de aplicar com o DMFit:


a) Modelo de Baranyi e Roberts

Modelo de Baranyi and Roberts (1994)-modelo completo

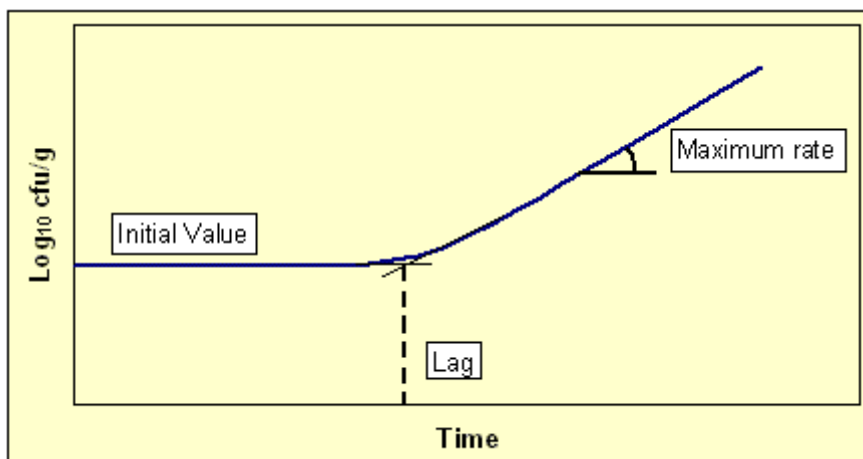


Modelo Baranyi e Roberts (1994)- no lag



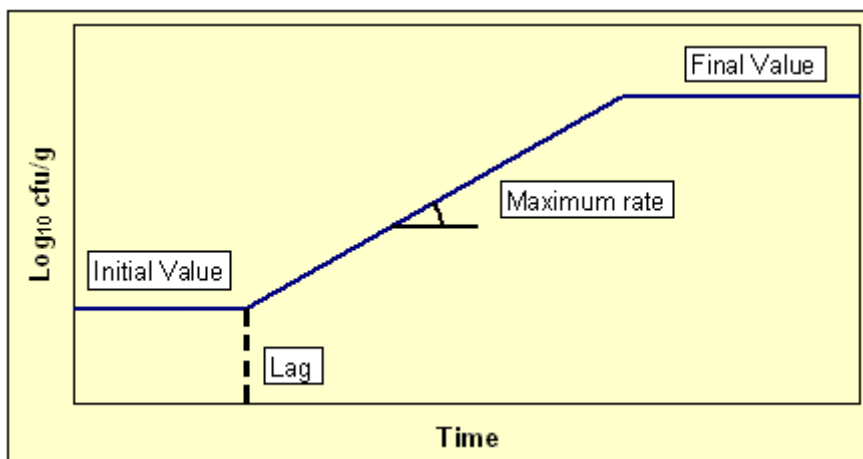
	IT₃		2009
	MICROBIOLOGIA PREDITIVA		Realizado por Marise de Oliveira
	APLICAÇÃO DE DADOS EXPERIMENTAIS DE CARGA MICROBIOLÓGICA - COMBASE		Revisão 0


Modelo de Baranyi e Roberts (1994)- no asymptot



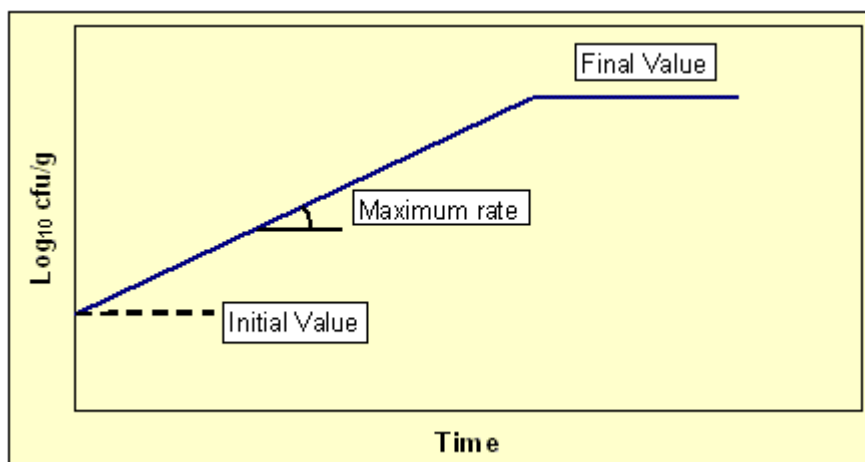
b) Modelos Tri-linear, Bifásico e Linear

Modelo Tri-linear

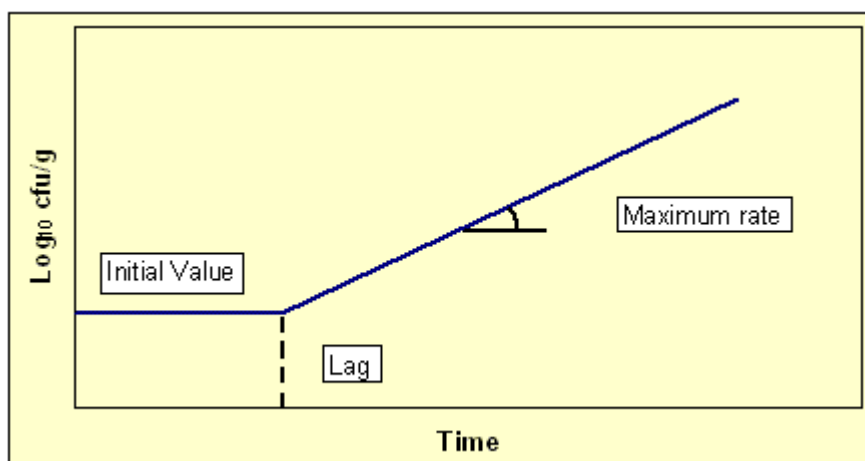


	IT₃		2009
	MICROBIOLOGIA PREDITIVA		Realizado por Marise de Oliveira
	APLICAÇÃO DE DADOS EXPERIMENTAIS DE CARGA MICROBIOLÓGICA - COMBASE		Revisão 0

Modelo Bifásico (no lag)



Modelo Bifásico (no asytmot)



Modelo Linear

